



**Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas
Universidad Nacional de Rosario**

Tesis de Doctorado

**Desarrollo de un ensayo para el tamizaje molecular
en Bancos de Sangre de las cepas circulantes del
Virus de la Inmunodeficiencia Humana tipo 1
en Argentina**

Bioq. Germán R. Perez

Desarrollo de un ensayo para el tamizaje molecular en Bancos de Sangre de las cepas circulantes del Virus de la Inmunodeficiencia Humana tipo 1 en Argentina

Germán R. Perez

Bioquímico

Universidad Nacional de Rosario

Esta Tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctor en Ciencias Biológicas, de la Universidad Nacional de Rosario y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta u otra Universidad. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el Laboratorio de Virología Humana del Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario (IBR), dependiente de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas (FCByF) y del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), durante el período comprendido entre 2007 y 2014, bajo la dirección de la Dra. Adriana A. Giri.

*“Cuando quieres algo,
todo el Universo conspira para que realices tu deseo”*
Paulo Coelho (La Quinta Montaña)

AGRADECIMIENTOS

“Un hombre siempre se perfecciona al lograr comprender algo”.

Ken Follet (*Los pilares de la Tierra*)

Durante el desarrollo de esta tesis muchas cosas han pasado. Siete años es un tiempo nada despreciable en el camino de una persona. Obviamente existen historias mucho más interesantes a ser narradas que transcurrieron en un mismo periodo de tiempo. A diferencia de *Heinrich Harrer*, no escalé el *Nanga Parbat* en los Himalayas, ni conocí al Dalai Lama, ni escribí un libro que se hará película (*“Siete años en el Tíbet”*). Tampoco luché contra los sátrapas ni conquisté el Imperio Persa como *Alejandro Magno*. Sin embargo, descansan en las páginas siguientes el desafío del desarrollo de algo propio, el arribo al éxito luego de innumerables pequeñas batallas perdidas, la conquista del máximo título académico posible, y la evolución de un pensamiento crítico que complementó mi formación profesional.

Entre las citas que alimentan este escrito no aparecerán la mayoría de las personas que, directa o indirectamente, me acompañaron en la realización de este trabajo. Por ello, considero importante mencionarlas en este apartado, y si bien seguramente no podré llevar a palabras lo que significaron para mí en este tiempo, auguro poder transmitir que una parte sustancial de esta tesis se las debo a todos ellos.

Muchas personas compartieron conmigo de forma completa esta experiencia que llamamos doctorado, otras se han perdido en el eterno devenir, y un número no menor se incorporaron en el transcurso de su desarrollo. Para aquellas que lograron estar en mi presente son mis agradecimientos.

A Adriana por su esfuerzo, paciencia y dedicación en la conducción, así como sus apreciados y relevantes aportes, comentarios y sugerencias durante el desarrollo de esta investigación.

A Daniela por su gran colaboración y predisposición a resolver mis inquietudes.

A Miguel por su apoyo constante y su confianza. Por ayudarme a recorrer este camino y aquellos paralelos que compartimos.

A María Rosa por su permanente interés en el progreso de los avances del proyecto.

A mis compañeros y amigos de laboratorio, Diego, Elisa, Florencia, Marina, Lola, Claudia Federico y Ana Laura, que formaron parte del trabajo diario, cuya presencia con sus apreciados y relevantes aportes, en mayor o menor medida, posibilitaron la culminación de este emprendimiento. A Nadia, Roxana, Alejandra y Amalia que a pesar de la distancia involuntaria que aconteció, supieron estar presentes en los momentos significativos de este camino. A todos ellos por la calidez que permitieron hacer del laboratorio un lugar agradable para estar.

A mis padres y mi hermano, por sus esfuerzos y apoyo durante mi formación académica, posibilitando los recursos y valores humanos necesarios poder concretar esta meta, superando todas las adversidades. A Ailén que me acompañó en el último tramo haciendo más llevadera la escritura.

A Maru por su sincera e incondicional amistad, y sus consejos... por darme ánimo en los momentos difíciles que permitieron mantenerme erguido, fomentado en mí el deseo de superación.

A mis amigos de la vida, Luciano, Martín, Germán F, Lucas, Eduardo, Germán R, Daniel, Rodrigo, Marcelo y Luciana, por los momentos, experiencias y discusiones compartidas. A Pablo, por trascender lo meramente académico y fomentar las bases de una amistad. A Edgardo, por estar presente con las palabras precisas en los buenos y malos tiempos, aún sin que lo supiese. Este trayecto de mi vida podría haber sido muy distinto sin ustedes.

Finalmente, mi reconocimiento a la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, pilar de la educación superior pública en esta ciudad, que me permitió una educación, un título, desarrollar mi vocación docente y compartir experiencias con personas extraordinarias.

Parte de los resultados que se describen en el presente trabajo de Tesis han sido publicados en las siguientes revistas y reuniones científicas:

Trabajos publicados:

- Villanova GV, Gardiol D, Taborda MA, Reggiardo V, Tanno H, Rivadeneira ED, **Perez GR**, Giri AA. Strategic approach to produce low-cost, efficient and stable competitive internal controls for the detection of RNA viruses using RT-PCR. *J Clin Microbiol*; 2007;45:3555-63 (ISSN: 1098-660X).
- **Perez GR**, Taborda MA, Giri AA. Detección de ácidos nucleicos virales en bancos de sangre. *Actualizaciones en SIDA* 2007;15:64-72 (ISSN: 0327-9227).

Presentaciones a reuniones científicas internacionales:

- **Perez GR**, Gardiol D, Taborda MA, Giri AA. Molecular tools for the early detection and the epidemiological characterization of HIV-1 infections based on the strains circulating in Argentina. *Comunicación libre*. XVIII International AIDS Conference. Viena (Austria). 18 – 23 de Julio de 2010. International AIDS Society. Resumen THPE0300 Vol 2, pág 388.
- Villanova GV, Taborda M, **Perez GR**, Gardiol DN, Giri AA. Construcción y utilización de un derivado recombinante del bacteriófago Q β como control interno en el diagnóstico por RT-PCR de virus con genoma ARN. *Comunicación libre*. Congreso Internacional y VI Simposio Nacional de Biotecnología. CABA (Argentina). 07 - 10 de Junio de 2005. REDBIO Argentina - Grupo Biotecnología. Resumen pág 249.

Presentaciones a reuniones científicas nacionales:

- **Perez GR**, Taborda MA, Bortolozzi R, Gardiol DN, Giri AA. Estrategia para el Tamizaje de Subtipos y Recombinantes del HIV-1 circulantes en Argentina. *Comunicación oral*. X Congreso Argentino de Virología. CABA (Argentina). 26 – 29 de Septiembre de 2011. Sociedad Argentina de Virología (SAV). Asociación Argentina de Microbiología (AAM). *Revista Argentina de Microbiología* 2011;43(S1):34 (ISSN:0325-7541).
- **Perez GR**, Maidana FV, Taborda MA, Gardiol DN, Ruzzini M, Giri AA. Evaluación de un Ensayo de detección del ARN-HCV para el Tamizaje Molecular de Donantes. *Comunicación oral*. X Congreso Argentino de Virología. CABA (Argentina). 26 – 29 de Septiembre de 2011. Sociedad Argentina de Virología (SAV). Asociación Argentina de Microbiología (AAM). *Revista Argentina de Microbiología* 2011;43(S1):39 (ISSN:0325-7541).
- **Perez GR**, Taborda MA, Bortolozzi R, Gardiol DN, GIRI AA. Estrategia para el Tamizaje de Subtipos y Recombinantes del HIV-1 Circulantes en Argentina. Comunicación libre (póster destacado para discusión oral). III Congreso Nacional de SIDA. San Juan (Argentina). 24 – 27 de Agosto de 2011. Sociedad Argentina Interdisciplinaria de SIDA (SAISIDA). *Actualizaciones en SIDA* 2011;19(S1):39 (ISSN: 0327-9227 / 1852-4001).

- **Perez GR**, Taborda MA, Gardiol DN, Giri AA. Desarrollo de controles internos competitivos para la detección temprana e cepas del HIV-1 circulantes en Argentina. *Comunicación oral*. XXIX Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Virología (SAV). Huerta Grande (Argentina). 10 – 12 de Diciembre de 2009. Asociación Argentina de Microbiología (AAM). Resumen pág 61.
- Villanova GV, Gardiol DN, Taborda MA, **Perez GR**, Giri AA. Controles para la detección de virus a ARN. *Comunicación libre*. Trabajo seleccionado para la 5° Edición de la exposición de productos innovadores del Concurso INNOVAR. CABA (Argentina). 14 – 17 de octubre de 2009. Secretaría de Planeamiento y Políticas en Ciencia e Innovación del Ministerio de Ciencia e Innovación del Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva. Resumen pág 22.
- **Perez GR**, Taborda M, Gardiol D, Giri AA. Desarrollo de un control interno para la detección precoz de cepas del VIH-1 circulantes en Argentina. *Comunicación libre*. II Congreso Nacional de SIDA. Salta (Argentina). 26 – 29 de Agosto de 2009. Sociedad Argentina Interdisciplinaria de SIDA (SAISIDA). *Actualizaciones en SIDA* 2009;17(S1):24 (ISSN: 0327-9227 / 1852-4001).
- **Perez GR**, Gomez Carrillo M, Taborda MA, Giri AA. Estrategia para la producción de controles internos competitivos estables para la detección de virus con genoma a ARN mediante RT-PCR. *Comunicación libre*. IX Congreso Argentino de Virología. CABA (Argentina). 22 – 25 de Septiembre de 2008. Sociedad Argentina de Virología. *Revista Argentina de Microbiología* 2008;40(S1):24 (ISSN: 0325-7541).
- **Perez GR**, Villanova GV, Taborda M, Reggiardo V, Tanno H, Rivadeneira E, Gardiol D, Giri A. Estrategia para la Producción de Controles Internos Competitivos Estables para la Detección de Virus con Genoma a ARN mediante RT-PCR. *Discusión oral de poster*. Congreso Nacional de SIDA. Paraná (Argentina). 05 – 08 de Septiembre de 2007. Sociedad Argentina de SIDA (SAS). *Actualizaciones en SIDA* 2007;15:SI27 (ISSN: 0327-9227).

INDICE

ABREVIATURAS	<i>i</i>
RESUMEN	<i>iii</i>
1. INTRODUCCIÓN	
1.1 BREVE HISTORIA DE LOS RETROVIRUS HUMANOS	1
1.2 ORIGEN DE LOS LENTIVIRUS HUMANOS	2
1.2.1 ORIGEN DEL HIV-2	2
1.2.2 ORIGEN DEL HIV-1	3
1.3 ORIGEN DE LA PANDEMIA DEL HIV/SIDA	5
1.4 ESTRUCTURA DEL VIRIÓN	6
1.5 CICLO BIOLÓGICO DEL HIV-1	9
1.5.1 TROPISMO CELULAR DEL HIV-1	9
1.5.2 EVENTOS TEMPRANOS DEL CICLO DE MULTIPLICACIÓN DEL HIV-1	9
1.5.2.1 Mecanismo de retrotranscripción en el HIV-1	11
1.5.2.2 Integración del ADN viral de HIV-1	11
1.5.3 EVENTOS TARDÍOS DEL CICLO DE MULTIPLICACIÓN DEL HIV-1	12
1.6 MECANISMOS PATOGENICOS Y CINÉTICA DE REPLICACIÓN VIRAL EN LA INFECCIÓN POR HIV-1	13
1.6.1 ETAPA TEMPRANA O AGUDA DE LA INFECCIÓN	13
1.6.2 ETAPA CRÓNICA DE LA INFECCIÓN	15
1.6.3 ETAPA FINAL DE LA INFECCIÓN	16
1.7 MARCADORES VIROLÓGICOS E INMUNOLÓGICOS DURANTE LA INFECCIÓN DEL HIV-1	16
1.8 DIVERSIDAD GENÉTICA DEL HIV-1	18
1.8.1 ESTRUCTURA POBLACIONAL DE LA INFECCIÓN DEL HIV-1	18
1.8.2 BASES MOLECULARES DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA DEL HIV-1	19
1.8.2.1 Diversidad por mutaciones en el HIV-1	20
1.8.2.2 Diversidad por recombinación en el HIV-1	20
1.9 METODOLOGÍA PARA LA DETECCIÓN DE LOS MARCADORES DE INFECCIÓN DEL HIV-1.	24
1.9.1 ENSAYOS INMUNOLÓGICOS: Detección de anticuerpos o antígenos virales	24
1.9.2 ENSAYOS MOLECULARES: Detección de ácidos nucleicos virales	25
1.9.3 DETERMINACIÓN CUALITATIVA DEL ARN-HIV Y VARIABILIDAD GENÉTICA	26
1.10 SEGURIDAD TRANSFUSIONAL Y TAMIZAJE MOLECULAR DE DONANTES	28
1.10.1 MARCO REGULATORIO Y APLICACIÓN DEL NAT EN NUESTRO PAÍS	31
1.10.2 REQUERIMIENTOS PARA LA INTRODUCCIÓN DE NAT EN MEDICINA TRANSFUSIONAL	32

1.10.3 BACTERIÓFAGO Q β COMO HERRAMIENTA EN BIOTECNOLOGÍA	33
2. OBJETIVOS	
2.1 OBJETIVO GENERAL	37
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	38
3. MATERIALES Y MÉTODOS	
3.1 CEPAS BACTERIANAS, PLÁSMIDOS Y BACTERIÓFAGOS	39
3.2 CONDICIONES Y MEDIOS DE CULTIVO	40
3.2.1 MEDIOS DE CULTIVO PARA CÉLULAS BACTERIANAS	40
3.2.2 CRECIMIENTO BACTERIANO	40
3.2.3 LISADOS BACTERIANOS	40
3.3 MUESTRAS CLÍNICAS DE PLASMA Y CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA	40
3.3.1 CONSIDERACIONES GENERALES	40
3.3.2 COMITÉ DE BIOÉTICA	41
3.4 TÉCNICAS DE MANIPULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS	41
3.4.1 ELECTROFORESIS DE ADN EN GELES DE AGAROSA	41
3.4.2 PURIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS (PRODUCTOS DE PCR, ADN PLASMÍDICO, ARN VIRAL, ARN FÁGICO)	41
3.4.3 ESTIMACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE ADN	42
3.4.4 DIGESTIÓN DE ADN CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN	42
3.4.5 LIGACIÓN DE MOLÉCULAS DE ADN	42
3.4.6 TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS <i>E. coli</i> POR ELECTROPORACIÓN	43
3.4.7 TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS <i>E. coli</i> POR SHOCK TÉRMICO	43
3.5 TÉCNICAS PARA EL TRABAJO CON BACTERIÓFAGOS	44
3.5.1 OBTENCIÓN DE LISADOS FÁGICOS	44
3.5.2 TITULACIÓN DE LOS LISADOS DE Q β_{WT} Y RECOMBINANTES	44
3.5.3 PURIFICACIÓN DE FAGOS POR EL MÉTODO MODIFICADO DE YAMAMOTO	44
3.5.4 ELIMINACIÓN DEL ADN PLASMÍDICO DE LOS LISADOS DE Q β	45
3.5.5 ELIMINACIÓN DEL ARN LIBRE DE LOS LISADOS DE Q β	45
3.6 REACCIONES DE AMPLIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS	45
3.6.1 ENSAYOS PARA VERIFICAR LA PRESENCIA DE PLÁSMIDO EN BACTERIAS TRANSFORMADAS	45
3.6.2 ENSAYOS DE AMPLIFICACIÓN PARA LA CONSTRUCCIÓN DE LOS Q β_{SUD} Y Q β_{SK}	46
3.6.3 ENSAYOS PARA DETECCIÓN TEMPRANA DEL HIV-1 CON DETECCIÓN COLORIMÉTRICA	46
3.6.3.1 Amplificación del ADN proviral del HIV-1	46
3.6.3.2 Amplificación del ARN del HIV-1	47
3.6.3.3 Revelado colorimétrico de las reacciones de amplificación	47

3.7 AMPLIFICACIÓN DE SECUENCIAS DEL HIV-1 PARA INFERENCIA FILOGENÉTICA	48
3.7.1 ENSAYOS DE AMPLIFICACIÓN PARA LA REGIÓN <i>gag</i> DEL HIV-1	49
3.7.1.1 Amplificación del ADN proviral del HIV-1	49
3.7.1.2 Amplificación del ARN del HIV-1	49
3.7.2 ENSAYOS DE AMPLIFICACIÓN PARA LA REGIÓN <i>vif</i> DEL HIV-1	50
3.7.2.1 Amplificación del ADN proviral del HIV-1	50
3.7.2.2 Amplificación del ARN del HIV-1	50
3.7.3 ENSAYOS DE AMPLIFICACIÓN PARA LA REGIÓN <i>nef</i> DEL HIV-1	51
3.7.3.1 Amplificación del ADN proviral del HIV-1	51
3.7.3.2 Amplificación del ARN del HIV-1	51
3.8 AMPLIFICACIÓN DE SECUENCIAS DEL HIV-1 PARA TIPIFICACIÓN EN SUBTIPOS	52
3.9 HERRAMIENTAS BIOINFORMÁTICAS	52
3.9.1 DISEÑO DE CEBADORES Y SONDAS	52
3.9.2 INFERENCIA FILOGENÉTICA	53
3.9.3 NÚMEROS DE ACCESO EN EL GENBANK	53

4. RESULTADOS

4.1 DESARROLLO DE UN ENSAYO PARA EL TAMIZAJE MOLECULAR DEL HIV-1

4.1.1 DISEÑO EXPERIMENTAL	54
4.1.2 DISEÑO DE CEBADORES Y SONDA PARA EL ENSAYO DE DETECCIÓN DE HIV-1 EN DESARROLLO	55
4.1.2.1 ANÁLISIS DE LOS CEBADORES ALL Y SUD	57
4.1.2.1 ANÁLISIS DE LA SONDA S-Gagp24	59
4.1.3 OPTIMIZACIÓN DE LA AMPLIFICACIÓN DE HIV-1 CON LOS CEBADORES ALL Y SUD	59
4.1.3.1 CONDICIONES DE AMPLIFICACIÓN CON LOS CEBADORES ALL	61
4.1.3.2 CONDICIONES DE AMPLIFICACIÓN CON LOS CEBADORES SUD	62
4.1.4 SELECCIÓN DE UN SISTEMA DE REFERENCIA: CEBADORES SK	64
4.1.5 ANÁLISIS DE DESEMPEÑO DE LOS CEBADORES EN EVALUACIÓN RESPECTO A LOS DE REFERENCIA EN LA DETECCIÓN DE CEPAS DE HIV-1 CIRCULANTES EN LA REGIÓN	66
4.1.6 ESTRATEGIA GENERAL PARA LA CONSTRUCCIÓN Y PRODUCCIÓN DE CICS	67
4.1.7 CONSTRUCCIÓN DE CICS PARA LA DETECCIÓN DEL ARN DE HIV-1	69
4.1.7.1 GENERACIÓN DEL FRAGMENTO QUIMERA PARA CADA SISTEMA DE CEBADORES	69
4.1.7.2 AMPLIFICACIÓN Y CLONADO DE LOS FRAGMENTOS QUIMERA (pA1 _{SUD} y pA1 _{SK})	71
4.1.7.3 EVALUACIÓN DE LOS CONSTRUCTOS pBRT7Qβ _{SUD4} Y pBRT7Qβ _{SK5}	73
4.1.8 ANÁLISIS DE LA PRODUCCIÓN E INFECTIVIDAD DE LOS FAGOS RECOMBINANTES Qβ _{SUD} Y Qβ _{SK}	75
4.1.9 ANÁLISIS DE LA ESTABILIDAD DE LOS FAGOS RECOMBINANTES Qβ _{SK} Y Qβ _{SUD} A 4°C	78
4.1.10 OPTIMIZACIÓN DEL SISTEMA DE PRODUCCIÓN DE FAGOS RECOMBINANTES	79

4.1.11 ANÁLISIS ESTRUCTURAL DE LA PROTEÍNA A1 EN LOS FAGOS Q β _{SUD} Y Q β _{SK}	80
4.1.12 IMPLEMENTACIÓN DE LOS FAGOS RECOMBINANTES COMO CICs	83
4.2 ESTRATEGIA PARA LA TIPIFICACIÓN MOLECULAR DEL HIV-1	
4.2.1 CONSIDERACIONES GENERALES	87
4.2.2 ESTRATEGIA DE TIPIFICACIÓN MOLECULAR DEL HIV-1 Y DISEÑO EXPERIMENTAL	87
4.2.3 ETAPA <i>IN SILICO</i>	91
4.2.3.1 SELECCIÓN DE LAS REGIONES GENÓMICAS DEL HIV-1: SEGMENTO INTERNO	91
4.2.3.2 CÁLCULO DE LAS T _m TEÓRICAS DE LOS SEGMENTOS INTERNOS SELECCIONADOS	92
4.2.3.3 PRUEBA DE REFERENCIA: SELECCIÓN DE LOS SEGMENTOS EXTERNOS DE <i>gag</i> , <i>vif</i> y <i>nef</i> PARA EL ANÁLISIS DE LA INFERENCIA FILOGENÉTICA	94
4.2.3.4 DISEÑO DE CEBADORES PARA LA AMPLIFICACION DE SEGMENTOS INTERNOS Y EXTERNOS	95
4.2.4 ETAPA EMPÍRICA	98
4.2.4.1 TIPIFICACIÓN DE LA REGION <i>gag</i> DEL HIV-1	98
4.2.4.1.1 ENSAYOS PARA LA AMPLIFICACIÓN DEL SEGMENTO EXTERNO (GAG _{EXT})	98
4.2.4.1.2 ENSAYOS PARA LA AMPLIFICACIÓN DEL SEGMENTO INTERNO (GAG _{INT})	102
4.2.4.2 CARACTERIZACIÓN DE LOS SEGMENTOS EXTERNOS E INTERNOS DEL GEN <i>gag</i>	105
4.2.4.2.1 INFERENCIA FILOGENÉTICA DEL SEGMENTO EXTERNO (GAG _{EXT}): DETERMINACIÓN DEL SUBTIPO REAL	105
4.2.4.2.2 DETERMINACIÓN DE LAS T _m EMPÍRICAS POR qPCR-MCA DE LOS SEGMENTOS INTERNOS (GAG _{INT})	105
4.2.5 TIPIFICACIÓN DE LA REGION <i>vif</i> DEL HIV-1	108
4.2.5.1 ENSAYOS PARA LA AMPLIFICACIÓN DE LOS SEGMENTOS EXTERNO (VIF _{EXT}) E INTERNO (VIF _{INT})	108
4.2.5.2 CARACTERIZACIÓN DE LA REGIÓN <i>vif</i> : DETERMINACIÓN DEL SUBTIPO REAL POR FILOGENIA (VIF _{EXT}) Y DE LA TM EMPÍRICA (VIF _{INT})	109
4.2.6 TIPIFICACIÓN DE LA REGION <i>nef</i> DEL HIV-1	111
4.2.6.1 ENSAYOS PARA LA AMPLIFICACIÓN DE LOS SEGMENTOS EXTERNO (NEF _{EXT}) E INTERNO (NEF _{INT})	111
4.2.6.2 CARACTERIZACIÓN DE LA REGIÓN <i>nef</i> : DETERMINACIÓN DEL SUBTIPO REAL POR FILOGENIA (NEF _{EXT}) Y DE LA TM EMPÍRICA (NEF _{INT})	113
4.2.7 ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS DE LA ESTRATEGIA DE TIPIFICACIÓN EN BASE A T _m	115
5. DISCUSIÓN	121
6. CONCLUSIONES	137
7. ANEXOS	139
8. BIBLIOGRAFÍA	150

ABREVIATURAS

ΔT_m	diferencia en los valores de mediana de las T_m
AAHI	Asociación Argentina de Hemoterapia e Inmunohematología
Amp	ampicilina
ANMAT	Administración Nacional de Medicamentos y Tecnología Médica
ARV	virus relacionado al SIDA (<i>del inglés, <u>A</u>IDS-<u>R</u>elated <u>V</u>irus</i>)
BS	bancos de sangre
CA	proteína de la cápside del HIV-1
CABA	Ciudad Autónoma de Buenos Aires
CAP	caperuza
CAS	cebador antisentido
CDC	Centro para el Control de Enfermedades (<i>del inglés, <u>C</u>enters for <u>D</u>isease <u>C</u>ontrol and <u>P</u>revention</i>)
CDs	células dendríticas
Cf	cloroanfenicol
CI	control interno
CIC	control interno competitivo
CN	control negativo
CP	control positivo
CR	control de reactivos
CRF	forma recombinante circulante (<i>del inglés <u>C</u>irculating <u>R</u>ecombinant <u>F</u>orm</i>)
CS	cebador sentido
C_T	ciclo umbral
CV	coeficiente de variación
CVP	carga viral plasmática
Cyp-A	ciclofilina A (<i>del inglés, <u>C</u>yclophilin <u>A</u></i>)
DLS	estructura de unión del dímero (<i>del inglés, <u>D</u>imer <u>L</u>inkage <u>S</u>tructure</i>)
DS	desvío estándar
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
EIA	enzimoinmunoensayo (<i>del inglés, <u>E</u>nzyme <u>I</u>mmuno<u>a</u>ssay</i>)
EMA	Agencia de Evaluación de Medicamentos Europea (<i>del inglés <u>E</u>uropean <u>M</u>edicines <u>A</u>gency</i>)
ELISA	enzimoinmunoensayo de inmunoabsorción (<i>del inglés, <u>E</u>nzyme-<u>L</u>inked <u>I</u>mmunosorbent <u>A</u>ssay</i>)
FDA	Administración de Drogas y Alimentos de EE.UU (<i>del inglés, <u>F</u>ood and <u>D</u>rug <u>A</u>dmistration</i>)
GALT	tejido linfoide asociado a intestino (<i>del inglés <u>G</u>ut-<u>A</u>sociated <u>L</u>ymphoid <u>T</u>issue</i>)
HAART	terapia antirretroviral de alta eficacia (<i>del inglés, <u>H</u>ighly <u>A</u>ctive <u>A</u>ntiretroviral <u>T</u>herapy</i>)
HBV	virus de la hepatitis B (<i>del inglés, <u>H</u>epatitis <u>B</u> <u>V</u>irus</i>)
HCV	virus de la hepatitis C (<i>del inglés, <u>H</u>epatitis <u>C</u> <u>V</u>irus</i>)
HIV	virus de la inmunodeficiencia humana (<i>del inglés, <u>H</u>uman <u>i</u>mmunodeficiency <u>v</u>irus</i>)
HIV-2	virus de la inmunodeficiencia humana 2 (<i>del inglés, <u>H</u>uman <u>I</u>mmunodeficiency <u>V</u>irus 2</i>)
HIV-1	virus de la inmunodeficiencia humana 1 (<i>del inglés, <u>H</u>uman <u>i</u>mmunodeficiency <u>v</u>irus 1</i>)
HMA	ensayo de movilidad del heterodúplex (<i>del inglés, <u>H</u>eteroduplex <u>M</u>obility <u>A</u>ssay</i>)
HPA	ensayo de protección de hibridación (<i>del inglés, <u>H</u>ybridization <u>P</u>rotection <u>A</u>ssay</i>)
HTLV-I	virus linfotrópico T humano 1 (<i>del inglés, <u>H</u>uman <u>T</u>-lymphotropic <u>v</u>irus 1</i>)
HTLV-II	virus linfotrópico T humano 2 (<i>del inglés, <u>H</u>uman <u>T</u>-lymphotropic <u>v</u>irus 2</i>)
HTLV-III	virus linfotrópico T humano 3 (<i>del inglés, <u>H</u>uman <u>T</u>-lymphotropic <u>v</u>irus 3</i>)
IN	integrasa del HIV-1
LAV	virus asociado a linfadenopatías (<i>del inglés, <u>L</u>ymphadenopathy <u>A</u>ssociated <u>V</u>irus</i>)
LB	medio de Luria Bertani
LTR	repeticiones terminales largas (<i>del inglés, <u>L</u>ong <u>T</u>erminal <u>R</u>epreat</i>)

MA	proteína de matriz del HIV-1
MA-P	proteína de matriz fosforilada del HIV-1
MCA	análisis de curvas de disociación (del inglés, <i>Melting Curve Analysis</i>)
MHA	ensayos de hibridación de multirregión (del inglés, <i>Multiregion Hybridization Assays</i>)
MHC-I	complejo de histocompatibilidad de clase I (del inglés, <i>Major Histocompatibility Complex class I</i>)
MHC-II	complejo de histocompatibilidad de clase II (del inglés, <i>Major Histocompatibility Complex class II</i>)
MMLV	virus de la leucemia murina de Moloney (del inglés, <i>Moloney Murine Leukemia Virus</i>)
MTOC	centro de organización de microtúbulos (del inglés, <i>MicroTubules Organizing Center</i>)
NAT	Tecnología de Amplificación de Ácidos Nucleicos (del inglés, <i>Nucleic Acid Testing</i>)
NC	nucleoproteína del HIV-1
NIBSC	<i>National Institute for Biological Standards and Control</i>
NLS	señales de localización nuclear (del inglés, <i>Nuclear Localization Signals</i>)
OMS	Organización Mundial de la Salud
PBMC	células mononucleares de sangre periférica (del inglés, <i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i>)
PBS	sitio de unión del cebador (del inglés, <i>Primer Binding Site</i>)
pC	proteína mayor de la cubierta del fago Q β
PCR	reacción en cadena de la polimerasa (del inglés, <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PEG	polietilenglicol
PIC	complejo de pre-integración (del inglés, <i>Pre-Integration Complex</i>)
pMa	proteína de maduración del fago Q β
PPT	región corta de polipurina (del inglés, <i>Polypurine Tract</i>)
PR	proteasa del HIV-1
PRRSV	Virus del Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino (del inglés, <i>Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus</i>)
PVS	periodo ventana serológico
qPCR	reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
RRE	elemento de respuesta a <i>rev</i> (del inglés, <i>Rev-Responsive Element</i>)
RT	transcriptasa reversa del HIV-1
RT-PCR	retrotranscripción seguida de reacción en cadena de la polimerasa
RT-qPCR	retrotranscripción seguida de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.
RTC	complejo de retrotranscripción (del inglés, <i>Reverse Transcription Complex</i>)
SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
SIV	virus de la inmunodeficiencia en simio (del inglés, <i>Simian immunodeficiency virus</i>)
SIVmac	virus de la inmunodeficiencia en simio de macacos Rhesus
SIVsm	virus de la inmunodeficiencia en simio del mangabeye gris
SIVcpz	virus de la inmunodeficiencia en simio de chimpancé
SIVrcm	virus de la inmunodeficiencia en simio del mangabeye de boina roja
SIVgsn	virus de la inmunodeficiencia en simio del cercopiteco de nariz blanca
SIVmus	virus de la inmunodeficiencia en simio del cercopiteco de hocico azul
SIVmon	virus de la inmunodeficiencia en simio del cercopiteco mona
SIVgor	virus de la inmunodeficiencia en simio del gorila
SU	glicoproteína de superficie del HIV-1
TAR	elemento de respuesta a <i>tat</i> (del inglés, <i>Tat-Responsive Element</i>)
Tc	tetraciclina
T _H	temperatura de hibridación
T _m	temperatura de fusión
TM	glicoproteína transmembrana del HIV-1
TMA	amplificación mediada por transcripción (del inglés, <i>Transcription-Mediated Amplification</i>)
URF	forma recombinante única (del inglés, <i>Unique Recombinant Form</i>)
VC	valor de corte
WB	Western Blot

RESUMEN

El Virus de la Inmunodeficiencia Humana 1 (HIV-1) es el agente causal del Síndrome de la Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA). El genoma de ARN del HIV-1 presenta variaciones genéticas significativas como resultado de mutaciones constantes, recombinaciones entre cadenas de ARN y presión evolutiva. La variación de las secuencias del virus distribuidas en la naturaleza permitió su clasificación en grupos (M, N y O), subtipos (A, B, C, D, F, G, H, J y K) y variantes recombinantes. Al demostrarse que algunas cepas recombinantes con patrones idénticos de mosaicismo se han establecido y diseminado en ciertas poblaciones, se determinó clasificarlas separadamente como Formas Recombinantes Circulantes (CRF). En Sudamérica, los subtipos B y F y las recombinantes BF son los predominantes. En Argentina circulan principalmente un 30% de subtipo B y un 65% de recombinantes BF con un predominio de la CRF12_BF.

La transmisión de infecciones por el HIV-1 en período de ventana serológico (PVS) es una complicación transfusional de gran importancia. La Tecnología de Amplificación de Ácidos Nucleicos (NAT) permite la detección del agente viral en ausencia de anticuerpos y su implementación en países desarrollados redujo el riesgo de transmisión de la infección por vía transfusional. En países en desarrollo, los costos de los ensayos comerciales de origen importado y la ausencia de desarrollos biotecnológicos regionales impidieron su aplicación.

En nuestro país la mayoría de los donantes son de reposición, o sea que están presionados a efectuar la donación, y generalmente son de primera vez, por lo que la prevalencia de marcadores para enfermedades transmitidas por vía transfusional es mayor que en los países desarrollados, en los cuales la mayoría de los donantes son voluntarios y de repetición. Está demostrado que la prevalencia de infecciones transmisibles es mayor en donantes de primera vez que en los de repetición.

La mayoría de los laboratorios que realizan el diagnóstico molecular de la infección del HIV-1 en Argentina utilizan ensayos o reactivos que han sido optimizados utilizando el subtipo B como cepa de referencia. Teniendo en cuenta el aumento de la diversidad del HIV-1 observada en los últimos años, en este trabajo de tesis se desarrolló una herramienta diagnóstica que permita la detección de los subtipos y formas recombinantes del HIV-1 circulantes en Argentina. Debido a que las reacciones de amplificación de ácidos nucleicos (PCR y RT-PCR) son un proceso enzimático con sensibilidad extrema, la calidad del ensayo molecular, en particular con fines diagnósticos, debe ser evaluada continuamente. Para asegurar la calidad del resultado, es necesario incluir en cada reacción de amplificación controles adecuados, siendo de gran importancia la utilización de un Control Interno (CI) a fin de poder verificar la eficiencia en el procesamiento de la muestra y su idoneidad para la amplificación y detección. La producción de un CI para ensayos que amplifiquen virus con genoma de ARN, como el HIV-1, ha sido particularmente difícil debido a la labilidad intrínseca de esta molécula. Un CI apropiado para ensayos moleculares con fines

diagnósticos debe ser homogéneo, estable, seguro para el personal de laboratorio que lo manipula y capaz de verificar tanto la eficiencia en el procesamiento de la muestra como en los procesos de amplificación y detección.

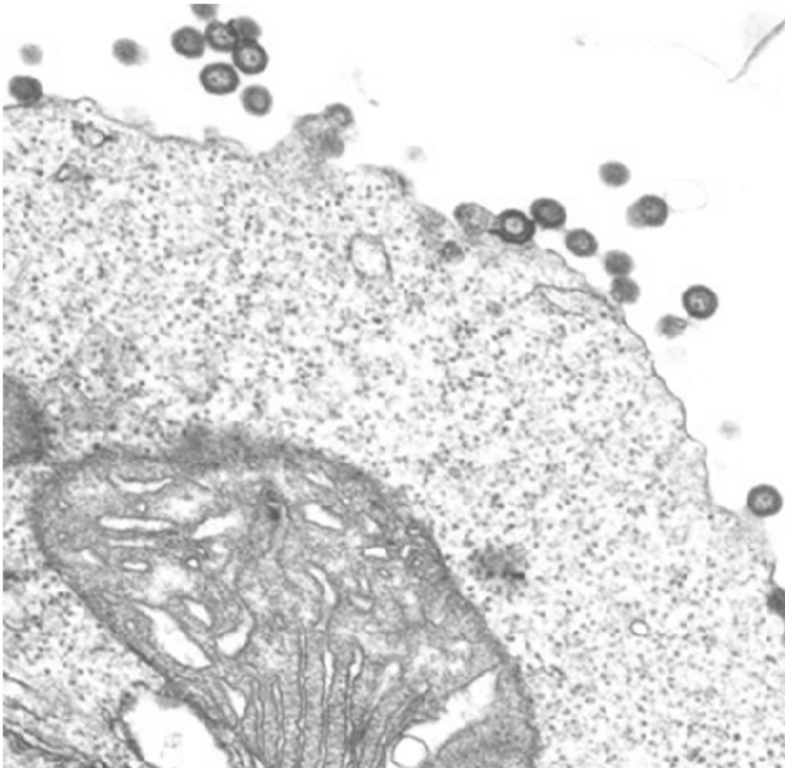
En base a estas consideraciones, en este trabajo de tesis se optimizó una RT-PCR para la amplificación de un fragmento de la región *gag* de los distintos subtipos e inter-subtipos del HIV-1, hibridación líquida de los amplicones resultantes con sondas para cada región génica y detección en microplaca (RT-PCR/SUD). Este ensayo incorpora un CI competitivo (CIC_{SUD}) que consiste en un fago Q β recombinante en el cual se han reemplazado secuencias fágicas por las del par de cebadores usados para la detección del ARN del HIV-1.

El CIC_{SUD} es añadido a la muestra de plasma, procesado conjuntamente con el ARN viral y amplificado con el mismo par de cebadores que el HIV-1 por RT-PCR. Los amplicones resultantes son discriminados mediante hibridación líquida con sondas específicas para cada *target* y detección colorimétrica en formato de enzoinmunoanálisis. El CIC_{SUD} demostró ser estable al menos por 24 meses a 4°C. El sistema RT-PCR/SUD/CIC_{SUD} puede detectar todos los subtipos del HIV-1 y factible de ser validado como sistema NAT para la detección sensible y específica de las cepas del HIV-1 circulantes en Argentina en los individuos que se encuentren en PVS.

La complejidad de la infección por el HIV-1 requiere de esfuerzos continuos que permitan conocer las cepas virales circulantes y su dinámica, de modo de asegurar una eficiente vigilancia genómica en cada región geográfica. Debido a esto, en este trabajo de tesis se presenta una nueva estrategia para identificar subtipos y cepas recombinantes a través de la temperatura de fusión (*T_m*) obtenida mediante qPCR y análisis de curvas de disociación. La nueva estrategia fue validada con una prueba de referencia basada en filogenia y podría ser de utilidad para monitorear la evolución de la infección por HIV-1 en nuestra región. Por medio de la selección de regiones genómicas con diferencias en las secuencias nucleotídicas (longitud o contenido GC) entre los subtipos B y F del HIV-1, se pudieron discriminar estos subtipos en dos regiones virales (*gag* y *vif*) a través de las *T_m* obtenidas. Su aplicación en muestras clínicas derivadas de individuos infectados de la región permitió identificar una cepa como intersubtipo F1 en la región *gag* y como subtipo B en la *vif*, patrón que no corresponde a ninguna de las CRFs descriptas y que podría ser una posible recombinante con origen evolutivo en cepas circulantes en San Pablo (Brasil).

La aplicación de estas herramientas permitirá evaluar la introducción del tamizaje molecular de donantes en el ámbito público de la provincia de Santa Fe y facilitar de manera fehaciente la identificación de las cepas circulantes en nuestra región para posicionarse de manera más efectiva en el control epidemiológico de las infecciones causadas por el HIV-1.

1. INTRODUCCIÓN



1.1 BREVE HISTORIA DE LOS RETROVIRUS HUMANOS.

En 1980, las teorías del origen vírico de los tumores estaban en su apogeo. Por esos años, Robert Gallo descubre el primer retrovirus humano, el **virus linfotrópico T humano 1** (HTLV-I, del inglés *Human T-Lymphotropic Virus 1*), un agente relacionado con la leucemia de células T y con un cuadro neurológico conocido como paraparesia espástica tropical [1]. El mismo grupo de trabajo describirá al año siguiente el **virus linfotrópico T humano 2** (HTLV-II, del inglés *Human T-Lymphotropic Virus 2*), relacionado esta vez con la tricoleucemia [2]. Paralelamente, a principios de esa década se detectaron casos mortales por infecciones oportunistas y neoplasias inusuales en adultos jóvenes de las comunidades homosexuales de las ciudades de Los Ángeles, San Francisco y Nueva York. En 1981, el médico Michael Gottlieb y su equipo de la Universidad de California describieron los 5 primeros casos y postularon que la causa de la enfermedad era una marcada disminución de las células T CD4⁺ de sangre periférica en los pacientes afectados, lo cual explicaría la aparición de diversas enfermedades por patógenos oportunistas muy poco frecuentes en adultos jóvenes [3]. Paralelamente, médicos franceses habían observado estas patologías en pacientes en hospitales de París, y constataron la aparición de cuadros similares en personas con hemofilia o que habían recibido transfusiones sanguíneas [4]. En 1982, Bruce Voeller, ex director de la *National Gay Task Force*, propone llamar a la nueva enfermedad **Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida** (SIDA). Para fines de ese año, en EE.UU. se habían identificado 1.614 casos con 659 muertes.

En 1983, un grupo de investigadores del Instituto Pasteur de París, encabezado por Luc Montagnier y Françoise Barré Sinoussi, identificó en una biopsia de ganglio linfático de un paciente con SIDA, un retrovirus no transformante que era capaz de infectar células T CD4⁺ que fue denominado **virus asociado a linfadenopatías** (LAV, del inglés *Lymphadenopathy Associated Virus*) [5]. A finales del mismo año, Mika Papovic del equipo de Robert Gallo del Instituto de Cáncer de EE.UU. identificó varias líneas celulares que se immortalizaban luego de ser infectadas con el nuevo retrovirus, el cual fue denominado **virus linfotrópico T humano 3** (HTLV-III, del inglés *Human T-Lymphotropic Virus 3*) [6]. En agosto de 1984, Jay Levy y su grupo de la Universidad de California informaron de forma independiente el aislamiento de un retrovirus en pacientes con SIDA de San Francisco que denominaron **virus relacionado al SIDA** (ARV, del inglés *AIDS-Related Virus*) [7]. En 1985, se clonó y secuenció el genoma viral, y se caracterizaron las proteínas de su envoltura [8].

Después de una importante polémica sobre la autoría del descubrimiento, y la diferente nomenclatura propuesta por cada uno de los laboratorios involucrados en los aislamientos, el Subcomité de Retrovirus Humanos del Comité Internacional sobre Taxonomía de los Virus publicó en mayo de 1986 una carta en *Science* [9] donde se propuso la denominación de **virus de la inmunodeficiencia humana** (HIV, del inglés *Human Immunodeficiency Virus*), la cual fue aceptada ampliamente por la comunidad internacional. Ese mismo año, el grupo de Luc Montagnier aisló un nuevo retrovirus, diferente al anterior, en pacientes con SIDA provenientes de África Occidental [10], relacionado evolutivamente a un virus de simios que

causaba inmunodeficiencia en macacos cautivos conocido como **virus de la inmunodeficiencia de simio** (SIV, del inglés *Simian Immunodeficiency Virus*) [11]. Este nuevo virus se denominó **virus de la inmunodeficiencia humana 2** (HIV-2, del inglés *Human Immunodeficiency Virus 2*), para diferenciarlo del primer virus, que se denominó **virus de la inmunodeficiencia humana 1** (HIV-1, del inglés *Human Immunodeficiency Virus 1*). Ambos retrovirus humanos, HIV-1 y HIV-2, poseen una organización genética similar y pueden causar SIDA. Sin embargo, mientras el HIV-1 es el causante de la pandemia, el HIV-2 está circunscripto principalmente a zonas del África occidental [12].

La familia *Retroviridae* se compone de un grupo diverso de virus que infectan una amplia variedad de vertebrados y comprende 7 géneros. Los **retrovirus simples** agrupan a los géneros *alpharetrovirus*, *betaretrovirus*, y *gammaretrovirus* y se componen de proteínas codificadas por los genes *gag*, *pol* y *env*. Los **retrovirus complejos** incluyen a los géneros *deltaretrovirus*, *epsilonretrovirus*, *lentivirus* y *espumavirus* que, además de los genes *gag*, *pol* y *env*, poseen genes que codifican para diversas proteínas reguladoras y accesorias [13]. Los virus causantes de SIDA en mamíferos son retrovirus complejos pertenecientes al género *lentivirus*.

1.2 ORIGEN DE LOS LENTIVIRUS HUMANOS.

El HIV-1 y el HIV-2 provienen de diferentes eventos de transmisión zoonótica independientes de virus de primates no humanos (denominados en su conjunto como SIV) que infectan en la naturaleza a poblaciones de simios de África (Figura 1A). Se han descrito más de 40 especies de SIV que se clasifican al menos en 8 grupos, infectando cada uno de ellos a diferentes especies de simios. Mientras algunos linajes han co-evolucionado con sus hospederos, otros lo han hecho mediante la transmisión entre especies de simios a humanos y entre diferentes especies de simios [14]. La infección por SIV generalmente no produce inmunodeficiencia en los simios que son sus hospederos naturales, a pesar de establecerse una infección crónica. Esta asociación se explica por la evolución conjunta de los diferentes hospederos y el SIV durante largos períodos de tiempo, permitiendo una adaptación mutua favorable para ambos. Sin embargo, un SIV puede comportarse como virulento cuando infecta a una especie distinta de primates [15].

1.2.1 ORIGEN DEL HIV-2.

El SIV de macacos *Rhesus* (SIVmac) fue el primero en ser caracterizado [11]. Poco después, se aislaron el HIV-2 de pacientes con SIDA [16] y el SIV del mangabeye gris (SIVsm) de especies en cautiverio [17] y en su hábitat natural [18]. Los análisis moleculares revelaron que los 3 virus estaban estrechamente relacionados entre sí (Figura 1B). De forma similar a los humanos, los macacos infectados con el SIV desarrollaban SIDA, lo cual sugiere que el SIVmac se originó como resultado de las transmisiones del SIVsm a macacos en cautiverio, siendo el mangabeye gris el hospedero natural para el SIVsm. El uso humano de los mangabeye como comida o mascotas habría facilitado la transmisión del SIVsm al ser

humano originando el HIV-2 y a los macacos originando el SIVmac, con la adquisición de patogenicidad de SIVsm en los nuevos hospederos [19].

1.2.2 ORIGEN DEL HIV-1.

El HIV-1 se divide en cuatro **grupos** denominados M, O, N y P, siendo cada uno de ellos un linaje diferente originado por eventos independientes de transmisión inter-especies (Figura 1C). La contribución a la epidemia por cada grupo varía considerablemente. El grupo M fue el primero en ser descubierto, es responsable de la pandemia del HIV/SIDA infectando a millones de personas y se ha aislado en casi todos los países del mundo. El grupo O fue descubierto en 1990, es causante de menos del 1% de las infecciones globales, y se limita en gran medida a Camerún, Gabón y países vecinos [20]. El grupo N fue identificado en 1998 y hasta el momento se han documentado 13 casos de infección en individuos de Camerún. Por último, el grupo P fue descubierto en 2009 en una mujer camerunesa residente en Francia y sólo ha sido identificado en una segunda persona, también de Camerún [21].

El SIV de chimpancé (SIVcpz) está relacionado filogenéticamente con el HIV-1 [22]. Los análisis filogenéticos de más de 30 cepas de SIVcpz revelaron la presencia de un mosaico genético complejo, generado por la recombinación de 2 linajes distintos de SIV. La hipótesis actual propone el origen del SIVcpz a partir de eventos de recombinación entre el SIV del mangabeye de boina roja (SIVrcm) y el SIV aislado de primates de la especie *Cercopithecus*: cercopiteco de nariz blanca (SIVgsn), cercopiteco de hocico azul (SIVmus) y cercopiteco mona (SIVmon). Los chimpancés son conocidos por cazar y matar a otros mamíferos, incluyendo primates, lo que sugiere que adquirieron el SIV en el contexto de la depredación [23].

Solo dos de las cuatro subespecies de chimpancés existentes se infectan con SIV: i) *Pan troglodytes troglodytes* (África occidental) con SIVcpzPtt, y ii) *Pan troglodytes schweinfurthii* (África oriental) con SIVcpzPts. El HIV-1 de los grupos M y N se originó directamente, pero de forma independiente a partir del SIVcpzPtt. Mientras que el HIV-1 del grupo N se ha mantenido confinado a un pequeño número de personas en Camerún, el HIV-1 del grupo M se extendió hacia el sur por el río Congo, desde donde probablemente se inició la epidemia mundial de HIV/SIDA [15].

A partir de muestras de materia fecal de gorilas obtenidas en el sur de Camerún se identificó un nuevo linaje de SIV (SIVgor) relacionado evolutivamente con el SIVcpzPtt, lo que sugiere que los gorilas (*Gorilla gorilla gorilla*) habrían adquirido el virus como resultado de un solo evento de transmisión a partir de un chimpancé infectado hace 100 - 200 años [24]. Los datos filogenéticos existentes apoyan un origen gorila del HIV-1 del grupo P, aunque las cepas de SIVgor que se han caracterizado son insuficientes como para identificar la región geográfica en la que esta transmisión podría haber ocurrido. Por el contrario, la fuente inmediata de HIV-1 del grupo O sigue siendo desconocida ya que no hay ningún SIV particularmente relacionado con este grupo. Por lo tanto, el HIV-1 del grupo O podría derivar de chimpancé o de gorila. No obstante, el hecho de que los virus de los grupos O y P estén más

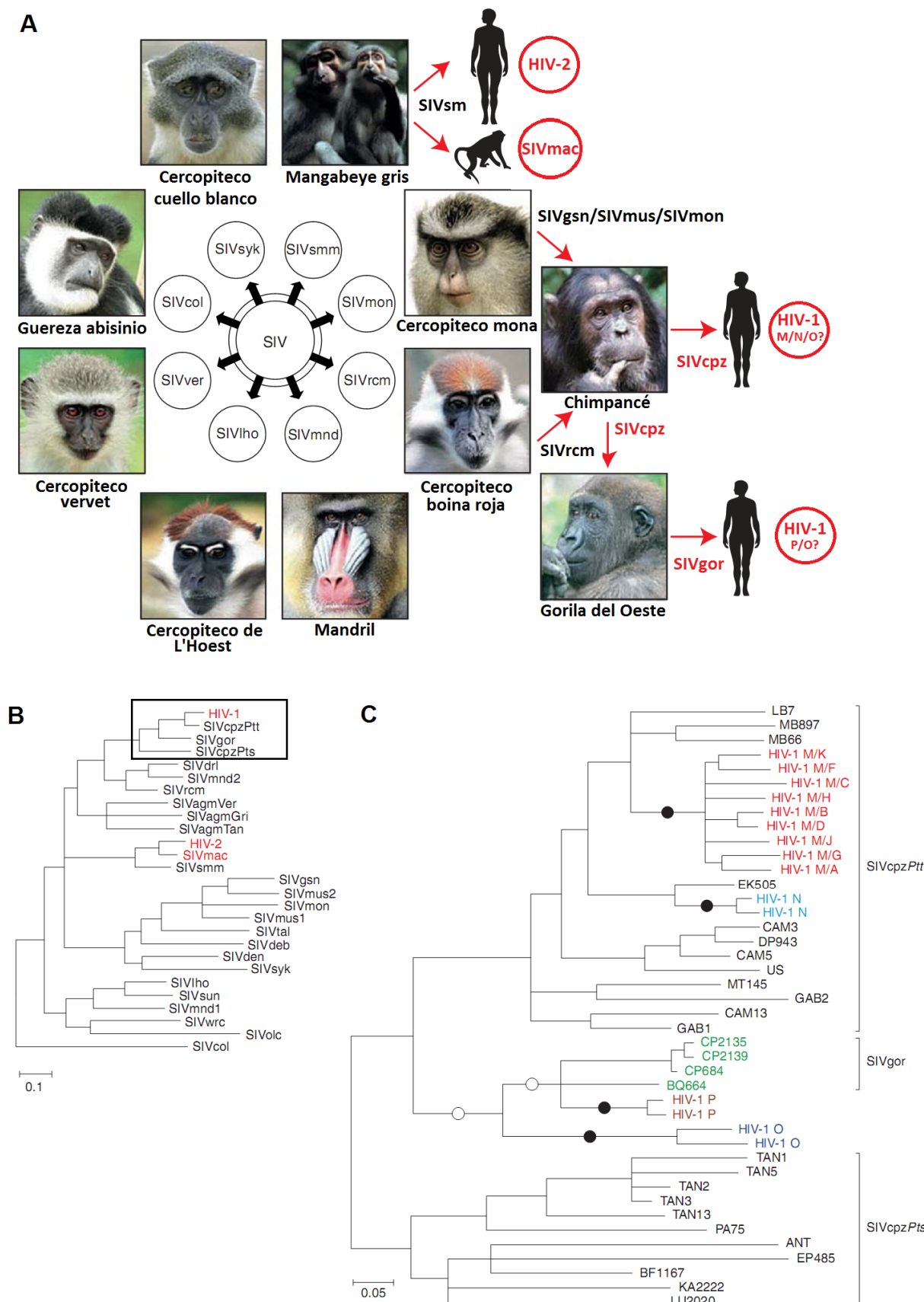


Figura 1. Origen de los Lentivirus Humanos.
Leyenda en la página siguiente.

Figura 1. Origen de los Lentivirus Humanos.

A. Los SIV de diversos simios africanos han cruzado la barrera de especie de otros simios y de humanos, generando nuevos patógenos. Los casos conocidos de transmisión cruzada entre especies, así como los virus resultantes, se muestran en color rojo. Adaptado de Sharp y col. [15]

B. Filogenia de los lentivirus. Se muestran las relaciones evolutivas entre las secuencias del gen *pol* (770 AA) de diversos lentivirus de primates. HIV-1, HIV-2 y SIVmac se destacan en rojo. El árbol filogenético se calculó utilizando métodos de máxima verosimilitud [25]. La barra de escala representa 0.10 sustituciones de AA por sitio. El clado correspondiente al HIV-1 se remarca en un cuadro.

C. Orígenes del HIV-1. Las relaciones filogenéticas de las cepas representativas de SIVcpz, de HIV-1 y de SIVgor se muestran para una región del gen viral *pol* (posiciones 3.887 - 4.778 nt en HIV-1/HXB2). Las secuencias de SIVcpz y de SIVgor se muestran en negro y verde, respectivamente. Los cuatro grupos de HIV-1, cada uno de las cuales representa una transmisión entre especies independiente, se muestran en diferentes colores. Los círculos negros indican las cuatro ramas donde ocurrió la transmisión inter-especie al humano. Los círculos blancos indican dos posibles ramas alternativas en las que se produjo la transmisión de los chimpancés a los gorilas. El árbol filogenético se calculó utilizando métodos de máxima verosimilitud [25]. La barra de escala representa 0.05 sustituciones de nucleótidos por sitio.

estrechamente relacionados con SIVcpzPtt que con SIVcpzPts sugiere que ambos grupos se originaron en el África occidental, lo cual es consistente con sus distribuciones actuales [15, 20].

1.3 ORIGEN DE LA PANDEMIA DEL HIV/SIDA.

La primera evidencia directa de infección por HIV-1 en humanos se obtuvo retrospectivamente a partir de una muestra de suero de 1959 y de una biopsia de ganglio linfático de 1960 de individuos de Kinshasa [26, 27]. Estas muestras permitieron la validación de herramientas bioinformáticas para estimar el “tiempo del ancestro común más reciente” y las tasas de evolución de los diversos linajes del virus. El HIV-1 del grupo M sería el linaje viral más antiguo en el ser humano, y se infiere que la transmisión inter-especies habría ocurrido entre los años 1853 y 1930. El grupo O parece tener su origen en una época similar, alrededor de 1920 (1890-1940). Por otro lado, el origen del grupo N sería más reciente y la transmisión inter-especies habría ocurrido alrededor de 1963 (1948-1977). El período de tiempo en que ocurrió la transmisión inter-especies que dio origen al grupo P aún es desconocido [20].

La infección del HIV-1 en humanos probablemente se mantuvo inicialmente limitada a pequeños grupos de individuos hasta que alcanzó, probablemente a través del Río Congo, un núcleo urbano en rápida expansión, como era la ciudad de Kinshasa alrededor de los años 1930–1940. En esta ciudad se detectó la mayor variedad de cepas y se especula que el virus se diseminó por el continente a través de contacto sexual y de prácticas sanitarias con material contaminado [27]. La amplia diseminación del HIV-1 del grupo M involucró una serie de eventos fundadores o “cuellos de botella poblacionales” que condujo al predominio de diferentes linajes denominados **subtipos** en diferentes áreas geográficas. Actualmente, se distinguen 9 subtipos del HIV-1 dentro del grupo M: A (A1/A2), B, C, D, F (F1/F2), G, H, J y K [28]. En lo concerniente al HIV-2, se han establecido hasta el momento 6 subtipos: A, B, C, D, F y G [29].

La actual hipótesis sobre el origen de los distintos subtipos del HIV-1 indica que los subtipos A y D se originaron en África Central y establecieron epidemias en África Oriental. El subtipo C se introdujo en el

sur de África, donde predomina actualmente, extendiéndose a la India y a otros países asiáticos. El subtipo B representa la mayoría de las infecciones de Europa y América, aunque es poco frecuente en África [30]. Una de las hipótesis que se plantea sobre el origen y diseminación del subtipo B sostiene que durante los años '60 algunos nativos haitianos (incluso un solo individuo) que se encontraban en el Congo post-colonial realizando tareas de cooperación sanitaria y educativa introdujeron el subtipo B ancestral en Haití [30]. Sucesivamente la infección se expandió y fue introducida en EE.UU. a finales de los años '70 por inmigrantes haitianos para luego diseminarse rápidamente en ese país, y posteriormente en Europa, Australia y Japón [30]. Sin embargo, la filogeografía del subtipo B es actualmente tema de debate. Otra hipótesis plantea la introducción y propagación del virus ancestral en la región del Caribe, seguido por su dispersión hacia el norte de América del Sur. Posteriormente, diversos grupos migratorios de distintos países de Latinoamérica introdujeron la infección a los EE.UU. y demás países de América del Norte [31]. Por otro lado, los análisis de filogeografía de la epidemia del inter-subtipo F1 revelaron su origen en Camerún y República Democrática del Congo a principios de 1940, para luego ser exportada, 10 años después, a América del Sur. Posteriormente, el inter-subtipo F1 se extendió a Angola y, desde allí, a Rumania a principios de 1960. Finalmente, llegó a Italia en la década de 1970 desde América del Sur y Rumania. La variante F1 Sudamericana parece estar caracterizada por múltiples eventos de introducción, mientras que la cepa F1 Rumana se extendió probablemente como resultado de un único evento [32]. El origen de los subtipos G, H, J y K por ahora permanecen poco definidos.

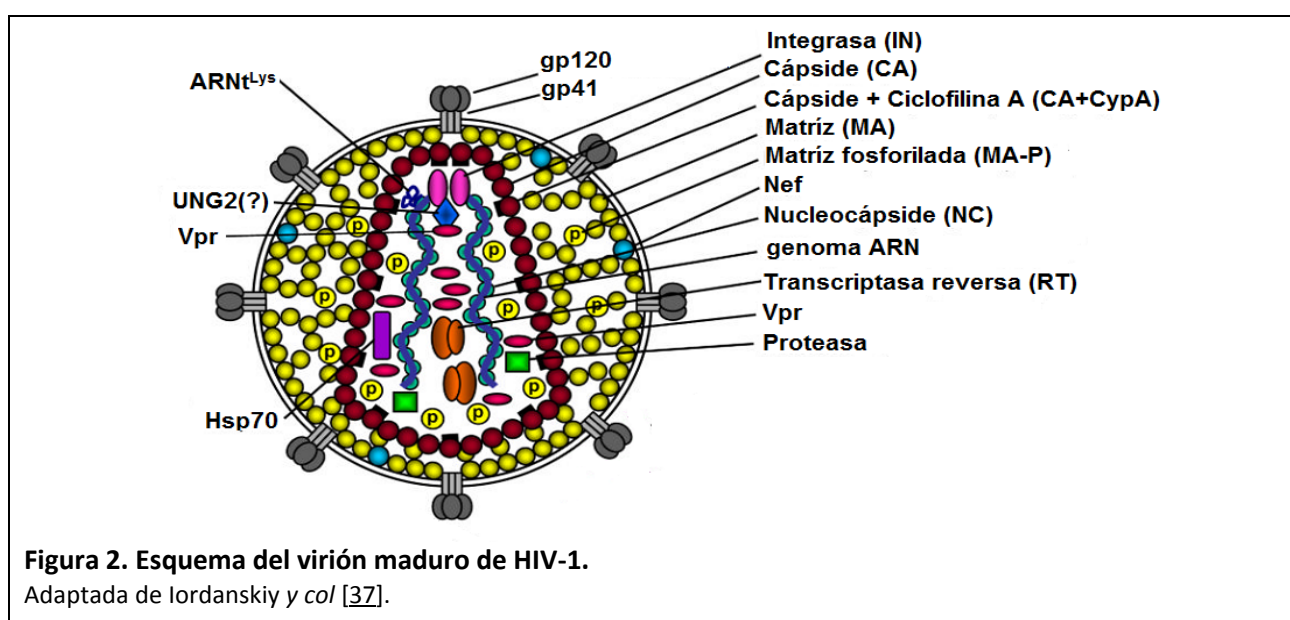
En la actualidad, el HIV/SIDA sigue siendo uno de los problemas sanitarios más graves a nivel mundial. El último informe de ONUSIDA (2013) reportó 35,3 millones de personas (rango: 32,2 – 38,8 millones) que conviven con el virus, lo que representa un aumento en comparación con años anteriores, ya que más personas reciben la **terapia antirretroviral de alta eficacia** (HAART, del inglés *Highly Active Antiretroviral Therapy*), logrando reducir el número de muertes por SIDA a 1,6 millones (rango: 1,4 – 1,9 millones), lo que representa un descenso del 30% de muertes totales a nivel global desde 2005 (2,3 millones, rango: 2,1 – 2,6 millones) [33]. La región de África subsahariana sigue siendo la más afectada representando el 69% de las personas seropositivas de todo el mundo (1:20 adultos) [33, 34]. Si bien, la cifra de nuevas infecciones a nivel mundial disminuyó un 33% en la última década [2,3 millones (rango: 1,9 – 2,7 millones)], una tendencia cada vez más importante en la epidemia es el creciente número de personas mayores de 50 años que viven con el HIV [3,6 millones (rango: 3,2 – 3,9 millones)] [33].

1.4 ESTRUCTURA DEL VIRIÓN.

El virión del HIV-1 es envuelto, de aproximadamente 110 nm de diámetro, posee una cápside icosaédrica y una nucleocápside cónica característica que contiene el genoma del virus (Figura 2). Su envoltura consta de: i) una bicapa lipídica obtenida de la membrana plasmática de la célula durante el proceso de gemación de nuevas partículas, por lo que contiene proteínas del hospedero, y ii) espículas

proteicas que consisten en un heterotrímero formado por 3 moléculas de gp120, la glicoproteína de superficie (SU), unidas de forma no-covalente a 3 moléculas de gp41, la glicoproteína transmembrana (TM). Cada virión tiene un número restringido de espículas (14 ± 7 espículas por virión) siendo la mayoría de ellas no funcionales [35].

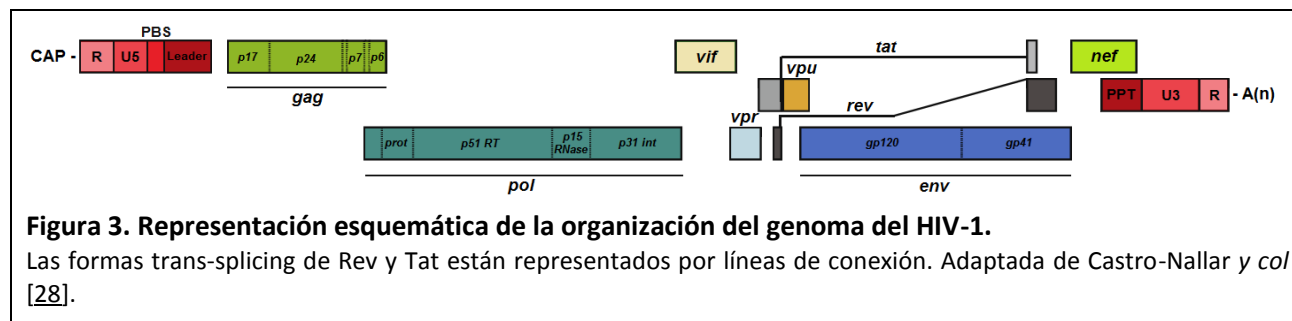
El genoma viral está constituido por ARN simple cadena de sentido positivo de 9.749 nucleótidos pseudodiploide, conteniendo 2 copias del ARN genómico que interaccionan entre sus extremos 5' en una región autocomplementaria denominada estructura de unión del dímero (DLS, del inglés *Dimer Linkage Structure*). El ARN viral se genera por la maquinaria transcripcional normal del hospedero y, por lo tanto, exhibe características de un ARNm celular: tiene una caperuza (CAP) en el extremo 5', y una cadena de poli-A de 200 residuos de largo en el extremo 3' [36].



En los extremos del ARN viral se identifican un grupo de secuencias no-codificantes con funciones esenciales en el ciclo de vida del HIV-1 (Figura 3):

- en el extremo 5': i) región R: región redundante con la región R del 3' que en este extremo se encuentra después de la caperuza; ii) región U5: incluye uno de los sitios *att* necesarios para la integración del provirus; iii) sitio de unión del cebador (PBS, del inglés *Primer Binding Site*): de 18 nucleótidos en el cual un ARNt se hibrida con el genoma viral y se inicia la síntesis de la cadena negativa de ADN ($ADN^{(-)}$); iv) región Leader: presente en todos los ARNm subgenómicos y contiene la señal de empaquetamiento para la incorporación del genoma en los viriones inmaduros.
- en el extremo 3': i) región corta de polipurina (PPT, del inglés *Polypurine Tract*): sitio de iniciación de la síntesis de la cadena positiva de ADN ($ADN^{(+)}$); ii) región U3: contiene un número de elementos claves que actúan en *cis* para la expresión de genes virales, y uno de los sitios *att* necesarios para la integración del ADN proviral; iii) región R: región redundante con la región R del extremo 5' que en este extremo se encuentra antes de la cadena de poli-A.

Por ser el HIV-1 un retrovirus complejo (Figura 3), además de los genes principales *gag*, *pol* y *env* característicos, codifica para 6 genes adicionales: i) 2 genes reguladores: *tat* y *rev*, y ii) 4 genes accesorios: *vif*, *vpu*, *vpr* y *nef*.



El gen *gag* codifica para una proteína precursora (p55) que durante la maduración del virión da lugar a 4 proteínas estructurales: i) la proteína de matriz (p17 o MA) asociada a la membrana, ii) la proteína de la cápside (p24 o CA) y iii) las dos nucleoproteínas (p7/p9 o NC). El gen *pol* codifica las 3 enzimas necesarias para el ciclo replicativo del virus: i) la proteasa (p15 o PR), ii) la transcriptasa reversa (p66 o RT) y iii) la integrasa (p31 o IN). El gen *env* codifica para un precursor poliproteico gp160 que es escindido por una proteasa celular en las proteínas gp120 (o SU) y gp41 (o TM) [35].

Las proteínas reguladoras *Tat* y *Rev* se acumulan en el núcleo celular y se unen a las regiones específicas TAR (del inglés *Tat-Responsive Element*) y RRE (del inglés *Rev-Responsive Element*), respectivamente, presentes en el transcripto primario retroviral. La proteína *Tat* es un potente activador de la transcripción y es esencial para la replicación del virus [38], mientras que la proteína *Rev* es un factor de exportación nuclear que facilita la salida al citoplasma de los ARNm inmaduros antes de ser procesados en el núcleo celular, permitiendo así la traducción de las proteínas codificadas por los genes *gag* y *pol*, y la exportación del ARN genómico [39].

Las proteínas accesorias *Nef*, *Vpr*, *Vif* y *Vpu* participan en diferentes mecanismos de evasión del sistema inmune e interactúan con la maquinaria celular para facilitar la propagación del virus. La proteína *Nef* induce la regulación negativa de las proteínas de membrana CD4 y de las del complejo de histocompatibilidad de clase I (MHC-I, del inglés *Major Histocompatibility Complex class I*) de la superficie de las células infectadas a fin de evadir la respuesta citotóxica mediada por las células T CD8⁺ [40]. La proteína *Vpr* es importante para el transporte del complejo de pre-integración al núcleo celular permitiendo al virus infectar células que no estén en división [41]. La proteína *Vif* es capaz de interactuar con una proteína celular de defensa antiviral denominada APOBEC3, anulando su efecto antiviral y favoreciendo la replicación viral [42]. La proteína *Vpu* interfiere con la proteína celular de membrana *tetherina*, que impide la liberación de los viriones de la membrana celular, anulando su función [43].

1.5 CICLO BIOLÓGICO DEL HIV-1.

1.5.1 TROPISMO CELULAR DEL HIV-1.

Aunque la proteína de membrana CD4 fue rápidamente identificada como un receptor necesario para la adsorción del virus a la célula [44], la caracterización de los co-receptores se prolongó por 12 años [45]. La **proteína CD4**, presente en la membrana celular, actúa como un receptor específico y común a todas las variantes virales. Por otro lado, numerosos miembros de la familia de receptores de quimiocinas pueden actuar como co-receptores virales para permitir la entrada del virus a la célula, siendo los principales el **CXCR4** y el **CCR5** [46]. El co-receptor CXCR4 tiene como ligando natural a SDF1/CXCL12 y se expresa de forma constitutiva en un gran número de poblaciones celulares que incluyen las células T CD4+ vírgenes y de memoria. El co-receptor CCR5 une a las quimiocinas RANTES y MIP-1, y se expresa de forma constitutiva en un porcentaje limitado de células, como macrófagos derivados de monocitos, células T CD4+ activadas y células dendríticas (CDs), requiriendo de la activación celular para su expresión *de novo* [47].

Dependiendo del co-receptor utilizado, el HIV-1 se clasifica fenotípicamente en tres tipos de variantes: *i*) variantes R5-trópicas que utilizan exclusivamente el co-receptor CCR5, *ii*) variantes X4-trópicas que utilizan solo el co-receptor CXCR4, y *iii*) variantes R5X4 (tropismo dual) que pueden utilizar ambos co-receptores [48]. Las variantes X4-trópicas está asociadas con la inmunosupresión y la etapa final de la enfermedad, mientras que las R5-trópicas predominan en la primoinfección por HIV-1 y en la etapa temprana de la enfermedad [49].

1.5.2 EVENTOS TEMPRANOS DEL CICLO DE MULTIPLICACIÓN DEL HIV-1.

En el proceso de adsorción, la interacción inicial se produce entre la gp120 de la envoltura viral y la proteína CD4 presente en las células *target*, e induce una serie de cambios conformacionales a fin de exponer el dominio de unión de la gp120 al co-receptor. Esta segunda interacción conlleva a cambios en la estructura de la gp41 que expone el péptido de fusión, un dominio altamente hidrofóbico que se ancla en la membrana plasmática de la célula. Esta estructura genera un movimiento de plegamiento de los dominios heptaméricos de la gp41 que hace que la membrana plasmática celular y la envoltura viral se aproximen y se fusionen (Figura 4A) [50].

Una vez fusionadas las membranas, se produce la internalización de la nucleocápside viral. Las proteínas MA-P y *Nef* interaccionan con los microfilamentos de actina provocando un rearrreglo del citoesqueleto y la formación del **complejo de retrotranscripción** (RTC, del inglés *Reverse Transcription Complex*) a pocas horas de la infección. Mientras la Hsp70 ayuda a estabilizar el RTC, la ciclofilina A (Cyp-A) se une a proteínas de la cápside protegiendo el ARN viral de la acción del factor de restricción TRIM5α. Así, en el interior del RTC puede llevarse a cabo el proceso de **retrotranscripción** del ARN viral a resguardo de los mecanismos de defensa antiviral de la célula (Figura 4B). Si bien hay factores virales y

celulares que ayudan en el proceso, las 2 actividades enzimáticas necesarias y suficientes para llevarlo a cabo están presentes en la RT: ADN-polimerasa (ARN y ADN dependiente) y ARNasa H. Cada virión contiene en promedio 50 copias de RT, y no está claro si la misma RT que sintetiza el ADN es la que participa en la degradación del ARN [51]. Las proteínas MA interaccionan con la dineína ayudando al tráfico del RTC al núcleo celular a través del sistema de microtúbulos hacia su transporte al núcleo de la célula (Figura 4C).

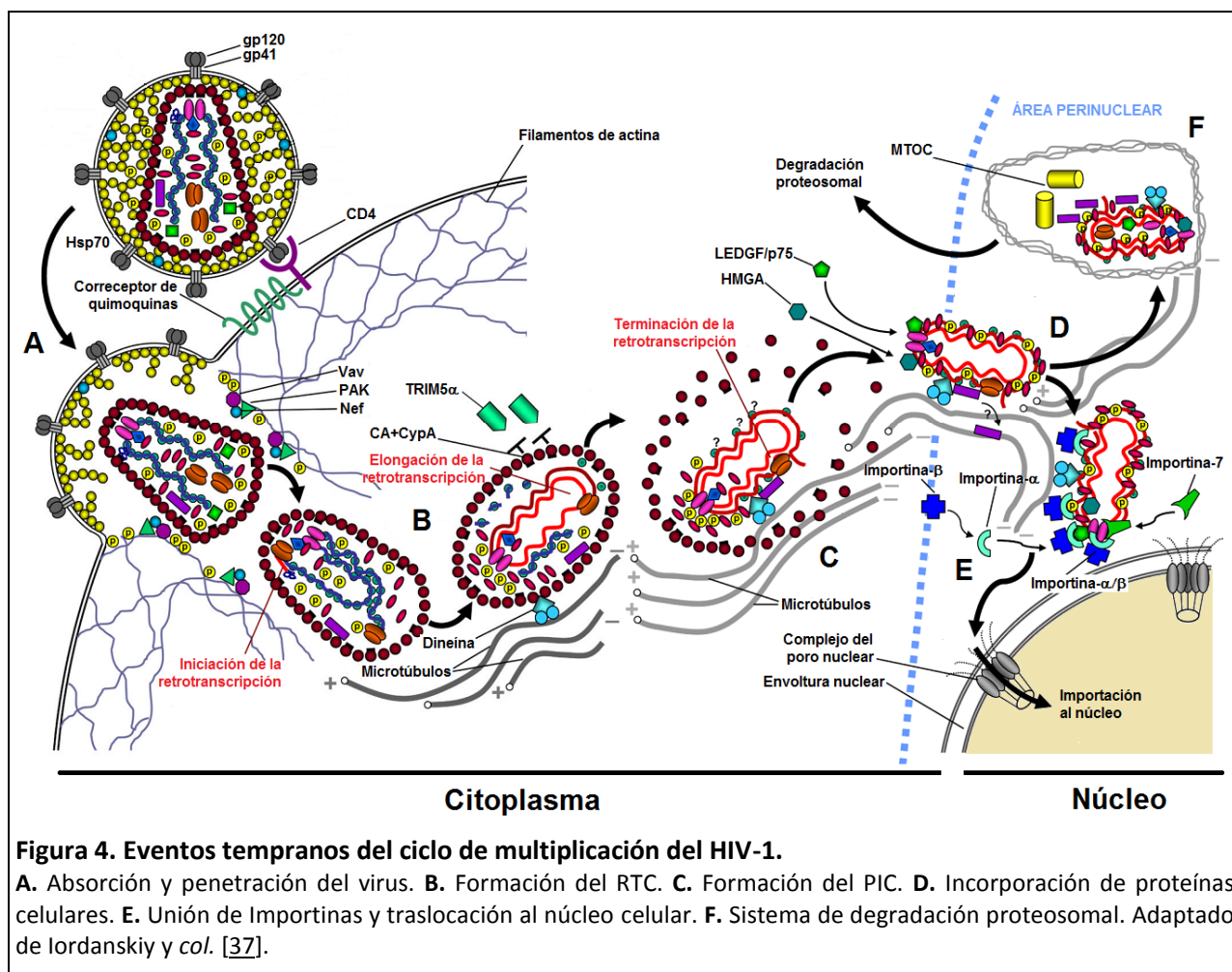


Figura 4. Eventos tempranos del ciclo de multiplicación del HIV-1.

A. Absorción y penetración del virus. **B.** Formación del RTC. **C.** Formación del PIC. **D.** Incorporación de proteínas celulares. **E.** Unión de Importinas y traslocación al núcleo celular. **F.** Sistema de degradación proteosomal. Adaptado de Iordanskiy y col. [37].

En algún momento al final del proceso de retrotranscripción, el RTC se convierte en el **complejo de pre-integración** (PIC, del inglés *Pre-Integration Complex*), mediante un reordenamiento proteico que resulta de la unión de las proteínas MA, NC y Vpr a lo largo del ADN viral sintetizado (Figura 4C). El PIC cumple una triple función: *i*) protege el ADN viral del ataque de las nucleasas celulares, *ii*) permite la exposición de las señales de localización nuclear (NLS, del inglés *Nuclear Localization Signals*) de las proteínas virales a las importinas, e *iii*) incorpora proteínas de la célula hospedera, como HMGA y LEDGF/p75, que contribuyen a proteger a la proteína IN de la proteólisis y al direccionamiento nuclear del PIC [37] (Figura 4D).

Durante el transporte citoplasmático, el PIC se une, mediante las NLS de las proteínas MA, IN, Vpr y LEDGF/p75, con los heterodímeros Importina- α/β , y probablemente a la Importina-7, culminando con la

interacción con las nucleoporinas del complejo del poro nuclear y posterior traslocación del ADN viral al núcleo (Figura 4E). Sin embargo, la mayoría de los PICs siguen una vía no productiva. En esta vía, los PICs son transportados hacia el centro de organización de microtúbulos (MTOC, del inglés *MicroTubules Organizing Center*) para su eliminación protosomal (Figura 4F) [37].

1.5.2.1 Mecanismo de retrotranscripción en el HIV-1.

La retrotranscripción inicia a partir del ARN de transferencia específico celular (ARNt^{LyS}) ubicado en la región PBS cercana al extremo 5' del genoma (Figura 5A), el cual es utilizado por la enzima como cebador. La síntesis de ADN se extiende hacia el extremo 5' del genoma generando un pequeño fragmento de ADN⁽⁻⁾ (Figura 5B) [52]. Como se ha mencionado previamente, ambos extremos del genoma de ARN presentan regiones repetitivas (dominio R), las cuales actúan como puente permitiendo que el ADN⁽⁻⁾ pueda ser transferido al extremo 3' del ARN molde (Figura 5C: primera transferencia de hebra). Como cada virión cuenta con dos copias de ARN genómico, esta transferencia puede realizarse hacia los dominios R del extremo 3' de cualquiera de ellas. Luego de la transferencia, la síntesis del ADN⁽⁻⁾ puede continuar a lo largo del genoma a medida que la ARNasa H degrada el ARN molde. Sin embargo, las regiones PPT en el ARN viral resisten a la degradación por la ARNasa H y servirán como cebador para la iniciación de la síntesis de la cadena de ADN⁽⁺⁾ (Figura 5D) [52, 53].

Cuando la RT genera el fragmento de ADN⁽⁺⁾ a partir de la región PPT, copia también los primeros 18 nucleótidos del cebador ARNt^{LyS} (Figura 5E), convirtiéndolo en sustrato para la ARNasa H. La degradación del ARNt^{LyS} deja un solo ribonucleótido en el extremo 5' del fragmento de ADN⁽⁻⁾. A este punto, la única región complementaria entre las cadenas de ADN⁽⁻⁾ y ADN⁽⁺⁾ son los 18 nucleótidos del sitio PBS. Estas dos secuencias complementarias pueden hibridar (Figura 5F: segunda transferencia de hebra), y la síntesis del ADN se extiende hacia los extremos 5' en ambas cadenas [52, 53]. El producto de la retrotranscripción es una molécula de ADN lineal de mayor longitud nucleotídica que el genoma de ARN del cual deriva (Figura 5G) debido a que las regiones no codificantes del genoma de ARN se amplificaron en cada extremo (U3-R-U5) dando lugar a las denominadas **repeticiones terminales largas** (LTR, del inglés *Long Terminal Repeat*). Las LTR son esenciales para el proceso de integración del ADN viral en el genoma celular y contienen las señales necesarias para la transcripción del provirus y su regulación [52, 53].

1.5.2.2 Integración del ADN viral de HIV-1.

El mecanismo de **integración** consta de tres pasos: *i*) la proteína IN se une específicamente a los sitios *att* de las LTRs y cataliza la escisión de dos nucleótidos en el extremo 3' formando radicales 3'-hidroxilo, *ii*) el ataque nucleofílico del radical 3'-hidroxilo al ADN celular con la formación de un enlace fosfodiéster, y *iii*) la reacción de ligación para integrar plenamente el ADN viral al genoma celular [54]. Si bien, cualquier sitio del ADN cromosómico puede servir como sitio aceptor para la integración, existe evidencia de regiones preferenciales relacionadas a factores asociados a la cromatina [55]. La integración proporciona

un entorno favorable para la expresión genómica eficaz, garantiza la herencia del virus en las células hijas durante la mitosis, y forma la base para la latencia del HIV-1 en los reservorios [56].

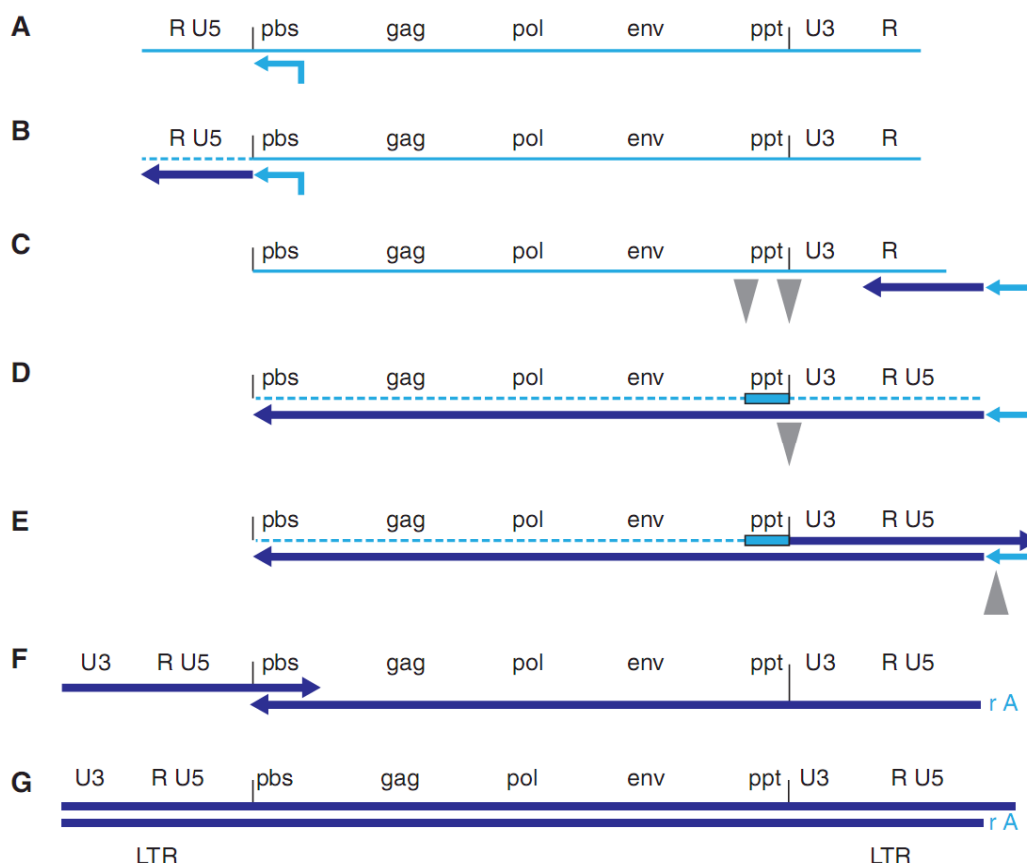


Figure 5. Mecanismo de retrotranscripción en retrovirus.

A. El ARN genómico (azul claro) con el cebador ARNt^{Lys} unido al sitio PBS en el extremo 5'. **B.** La RT inicia la síntesis del $\text{ADN}^{(-)}$ (azul oscuro) mientras la actividad ARNasa H degrada el ARN molde (línea de trazos). **C.** Primera transferencia de hebra entre las regiones R. **D.** Se completa la síntesis del $\text{ADN}^{(-)}$, a medida que se degrada el ARN molde. La región PPT, resiste a la degradación y sirve como cebador para la síntesis del $\text{ADN}^{(+)}$. **E.** La síntesis del $\text{ADN}^{(+)}$ continúa hasta que se copian los primeros 18 nucleótidos del ARNt^{Lys} , permitiendo a la ARNasa H degradar dicho cebador. **F.** Segunda transferencia de hebra entre las regiones PBS de ambas cadenas de ADN. **G.** La extensión de ambas cadenas conduce a la síntesis de los LTR, generándose el ADN doble hebra lineal, que es el sustrato para la integración del genoma retroviral en el celular. Adaptado de Hu y col. [52].

1.5.3 EVENTOS TARDÍOS DEL CICLO DE MULTIPLICACIÓN DEL HIV-1.

A partir del estado de integración, el HIV-1 puede permanecer latente, replicarse de forma controlada o experimentar una replicación masiva con el consiguiente efecto citopático sobre la célula infectada. La permanencia del ADN proviral en el genoma celular está determinada por el tiempo de vida de la célula que lo contiene y, en gran medida, por el estado de activación metabólica de la célula infectada [57].

La iniciación de la transcripción implica el comienzo de la síntesis del ARNm viral a partir del ADN proviral por parte de la ARN polimerasa II y depende de factores celulares que interaccionan con las secuencias reguladoras localizadas en el LTR del extremo 5' del provirus. El factor celular NF- κ B regula la expresión de múltiples genes celulares que participan en los procesos de reconocimiento y activación

inmunitarios, y es el principal elemento regulador de la transcripción del HIV-1 [58]. En el caso de las células T CD4⁺, el NF-κB no existe en forma activa en las células vírgenes y su expresión es inducida en el curso de los procesos de activación inmunológica, lo que explica que la replicación viral esté estrechamente relacionada con el estado de activación celular. [50]. El HIV-1 parece haberse adaptado a las características biológicas únicas de cada tipo de célula que infecta, de forma que el virus puede existir en distintos estados de replicación y en diferentes compartimentos tisulares, lo que permitiría que persista a pesar de la respuesta inmune del individuo y de la HAART.

1.6 MECANISMOS PATOGENICOS Y CINÉTICA DE REPLICACIÓN VIRAL EN LA INFECCIÓN POR HIV-1.

1.6.1 ETAPA TEMPRANA O AGUDA DE LA INFECCIÓN.

La mayoría de las infecciones a nivel mundial se producen por exposición sexual al HIV-1, sin protección, a través del tracto genital o mucosa rectal. Rutas menos frecuentes, pero igualmente importantes epidemiológicamente, incluyen la transmisión con material contaminado en usuarios de drogas intravenosas, la exposición a componentes sanguíneos y derivados contaminados por transfusiones, la infección vertical de una madre infectada al hijo durante el embarazo, el parto o la lactancia, y las infecciones ocupacionales del personal de salud [33].

El HIV-1 puede atravesar la mucosa genital por: *i*) transporte trans-epitelial (transcitosis), *ii*) captura e internalización de viriones en las CDs del epitelio, o *iii*) infección de células T CD4⁺ intra-epiteliales (Figura 6A). Los cambios en el epitelio vaginal durante el ciclo menstrual y en respuesta a las hormonas administradas exógenamente, así como la presencia de afecciones inflamatorias preexistentes que puedan causar microulceraciones y microrupturas en el epitelio, favorecen la rápida exposición de las células susceptibles de la submucosa al virus [59].

Las células epiteliales pueden capturar selectivamente viriones R5-trópicos que infectarán células que expresan el receptor CCR5. Los estudios *in vivo* indican que las CDs inmaduras intraepiteliales y submucosas, los macrófagos y las células T CD4⁺ de la lámina propia de las mucosas vaginal y rectal, que constituyen el **tejido linfoide asociado a intestino** (GALT, del inglés *Gut-Associated Lymphoid Tissue*), son las primeras poblaciones celulares en ser infectadas por el HIV-1, detectándose ADN proviral entre las 24 y 72 horas post-exposición [60].

En las 24 a 48 horas siguientes, las CDs migrarán a los ganglios linfáticos periféricos (Figura 6A). Las CDs pueden ser infectadas directamente o unir viriones a través de receptores de adsorción pertenecientes a la familia de las lectinas (DC-SIGN y L-SIGN) que son endocitados para ser degradados en un compartimento ácido. Algunos viriones pueden escapar de la degradación al ser internalizados en compartimentos no lisosomales conservando la infectividad durante largos periodos de tiempo [59, 61]. En la paracorteza, región del ganglio con gran cantidad de células T CD4⁺, las CDs presentan al antígeno procesado en el contexto del complejo de histocompatibilidad de clase II (MHC-II, del inglés *Major*

Histocompatibility Complex class II) desencadenando la respuesta inmune adaptativa e infectando a las células T CD4⁺ en *trans* (*sinapsis virológica*) [61]. Esto permite la amplificación en forma explosiva de la infección y la producción viral [62]. En estos momentos la viremia aumenta de forma exponencial, se duplica cada 7,2 horas durante las primeras 2 a 3 semanas de la infección, y se alcanza el pico más elevado en plasma, secreciones genitales y otros compartimentos a las 4 semanas post-infección. En este periodo, la mayoría de los individuos infectados experimentan el denominado **síndrome retroviral agudo**, que se define como manifestaciones clínicas similares a la gripe, acompañado de fiebre, linfadenopatías, mialgias, anorexia y diarrea, asociados con una elevada viremia en plasma (1×10^{10} copias/ml) [63].

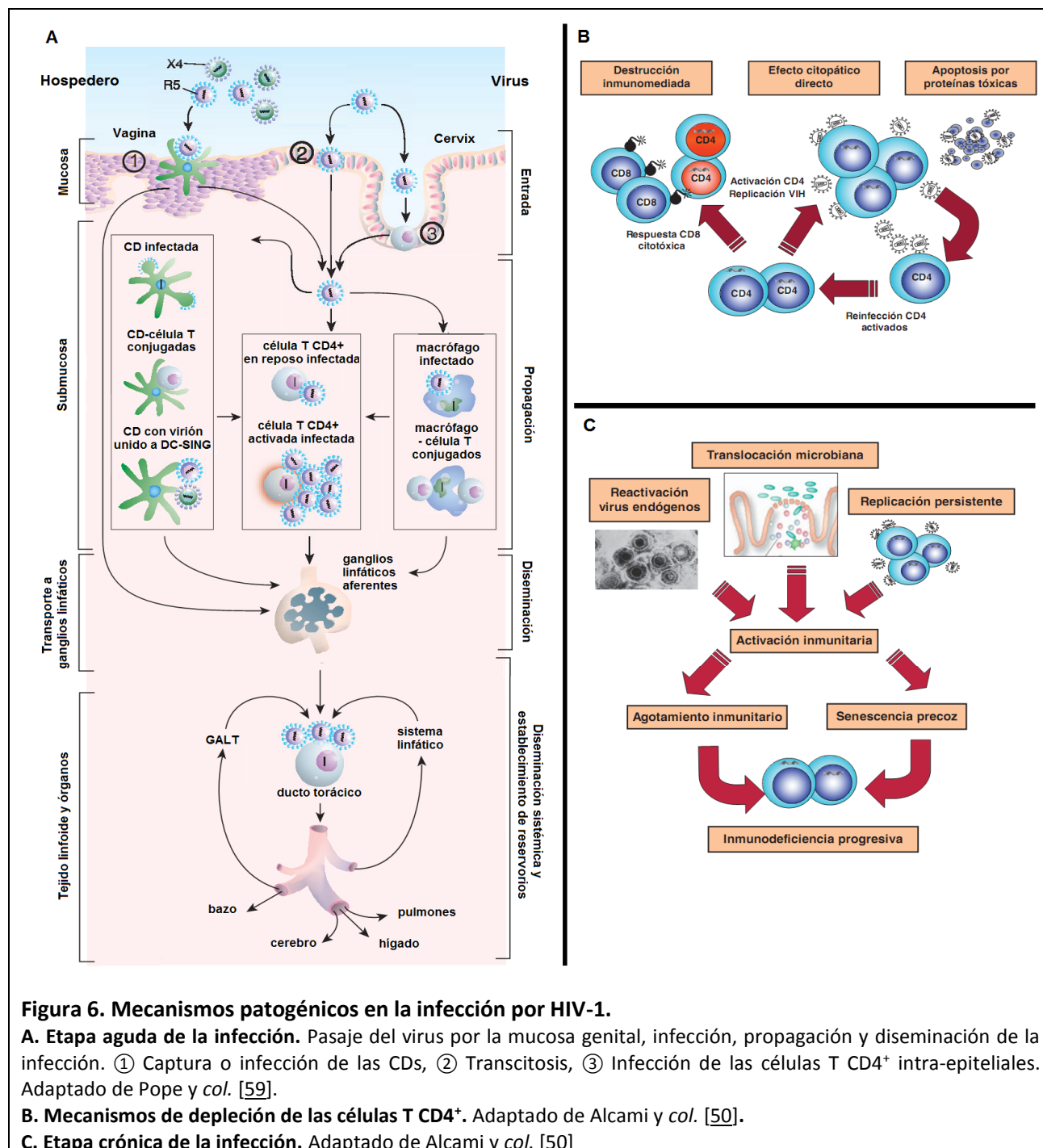


Figura 6. Mecanismos patogénicos en la infección por HIV-1.

A. Etapa aguda de la infección. Pasaje del virus por la mucosa genital, infección, propagación y diseminación de la infección. ① Captura o infección de las CDs, ② Transcitosis, ③ Infección de las células T CD4⁺ intra-epiteliales. Adaptado de Pope y col. [59].

B. Mecanismos de depleción de las células T CD4⁺. Adaptado de Alcamí y col. [50].

C. Etapa crónica de la infección. Adaptado de Alcamí y col. [50]

Diversos estudios demostraron que la primoinfección se produce a expensas de una única partícula viral (por lo tanto, una única secuencia genómica) en más del 80% de los casos estudiados, siendo los casos restantes originados por un número muy reducido de secuencias. El origen monoclonal u oligoclonal de la infección por HIV-1 es coherente con el riesgo estimado de transmisión por contacto heterosexual (1/200–300 casos), siendo necesaria múltiples exposiciones sexuales para que ocurra la infección [64].

La fase aguda de la infección está acompañada de una disminución drástica en los niveles de células T CD4⁺ en sangre periférica, asociada al agotamiento masivo de las células T CD4⁺ en el sistema GALT. Este descenso representa uno de los marcadores más importantes de la infección y se debe a (Figura 6B): i) alteración en la homeostasis de las células T CD4⁺, ii) destrucción de células T CD4⁺ por efecto citopático directo, y iii) mecanismos indirectos de destrucción de células T CD4⁺ por mecanismos inmunitarios (reconocimiento y destrucción por las células T CD8⁺ al expresar péptidos virales en sus membranas a través de las MHC-I) o por la acción de proteínas tóxicas del virus (inducción de apoptosis en células no infectadas) [50].

Entre las 4 y 12 semanas de la infección, aparecen los diferentes tipos de anticuerpos séricos contra el HIV-1 y se pone en marcha la respuesta celular específica, altamente eficaz para limitar la replicación vírica. La infección por HIV-1 induce una intensa respuesta humoral, pero la producción de anticuerpos con capacidad neutralizante es escasa y su presencia no se asocia con protección. La respuesta celular constituye el mecanismo más importante de protección, y su intensidad y permanencia en el tiempo se correlaciona con el control de la replicación viral. En los meses posteriores, la viremia alcanza un estado de equilibrio dinámico (punto de equilibrio viral o *set point*), que es un factor determinante en la progresión de la enfermedad en las personas infectadas sin tratamiento [65].

1.6.2 ETAPA CRÓNICA DE LA INFECCIÓN.

Esta etapa se caracteriza por persistir una elevada actividad replicativa viral que es contrarrestada por la regeneración de las células T CD4⁺ (Figura 6C). Utilizando modelos matemáticos se ha estimado que diariamente se producen entre 10^9 y 10^{10} partículas virales en un individuo infectado, mientras que 10^8 células T CD4⁺ son destruidas en el mismo período de tiempo [66].

La infección por HIV-1 causa marcados cambios morfológicos y funcionales en la mucosa del intestino aumentando la permeabilidad intestinal y permitiendo el paso de productos microbianos a la circulación sanguínea (*traslocación bacteriana*). Esto conduce la activación del sistema de inmunidad innata y a un estado de inflamación persistente asociado a la infección [67]. Las nuevas poblaciones de células T CD8⁺ generadas muestran disminución de su capacidad citolítica, lo que sugiere que en la infección por HIV-1 existe un agotamiento o envejecimiento precoz del sistema inmunológico debido a la sobrecarga antigénica extrema que se produce durante el curso de la infección. A pesar de esto, los pacientes suelen mantenerse asintomáticos [67].

La duración de esta fase es altamente variable y depende de un complejo equilibrio entre factores del hospedero y del virus, no comprendidos en profundidad, que conduce a diferentes formas y tiempos de progresión de la enfermedad. La mayoría de los pacientes (80% - 90%) progresan a SIDA a partir de los 5 años de la infección, con un tiempo medio de progresión de 10 años, y son denominados **progresores típicos**. Entre un 5 – 10% de las personas infectadas desarrollan SIDA entre 1 y 5 años post-infección, constituyendo los **progresores rápidos** [68].

Desde los comienzos de la epidemia, se observó que una minoría de los pacientes infectados (5 – 10%) permanecía asintomática luego de más de 10 años de seguimiento, manteniendo estables sus recuentos de células T CD4⁺ en plasma en el tiempo. Los pacientes con estas características fueron denominados **controladores**. Dentro de este grupo de individuos se distinguen 3 categorías: i) no progresores a largo plazo, con valores de viremia menores a 2.000 copias/ml, ii) controladores de viremia, con niveles de viremia entre 50 y 2.000 copias/ml, y iii) controladores de elite, con viremias menores a 50 copias/ml o indetectables [69]. La definición de estos subgrupos de controladores no es uniforme en la literatura ya que se basa fundamentalmente en el límite de detección de los ensayos de cuantificación de la viremia (carga viral) utilizados en la última década.

Las diferencias en progresión observadas en los individuos infectados por el HIV-1 son evidentemente multifactoriales. Entre los factores más estudiados se encuentran los polimorfismos en genes humanos (CCR5-Δ32), los inmunológicos (alelo HLA-B5701) y los originados en el virus (variación genética asociada a variantes virales atenuadas o de escape a la respuesta inmune) [70].

1.6.3 ETAPA FINAL DE LA INFECCIÓN.

La etapa final en la historia natural de la enfermedad se caracteriza por la aparición de infecciones oportunistas, el descenso marcado del número de células T CD4⁺ en plasma y la elevación de la viremia. Es a partir de este momento cuando el individuo infectado es considerado como enfermo de SIDA. El progresivo deterioro del sistema inmune trae como consecuencia una incapacidad en el individuo infectado para controlar la replicación viral persistente, provocando el incremento de la viremia con una mayor generación de cepas mutantes, lo que a su vez aumenta las posibilidades de evasión viral y la selección de variantes X4-trópicas más citopáticas. La detección de estas variantes se asocia a una disminución en el recuento de células T CD4⁺ y a un mal pronóstico de supervivencia [71].

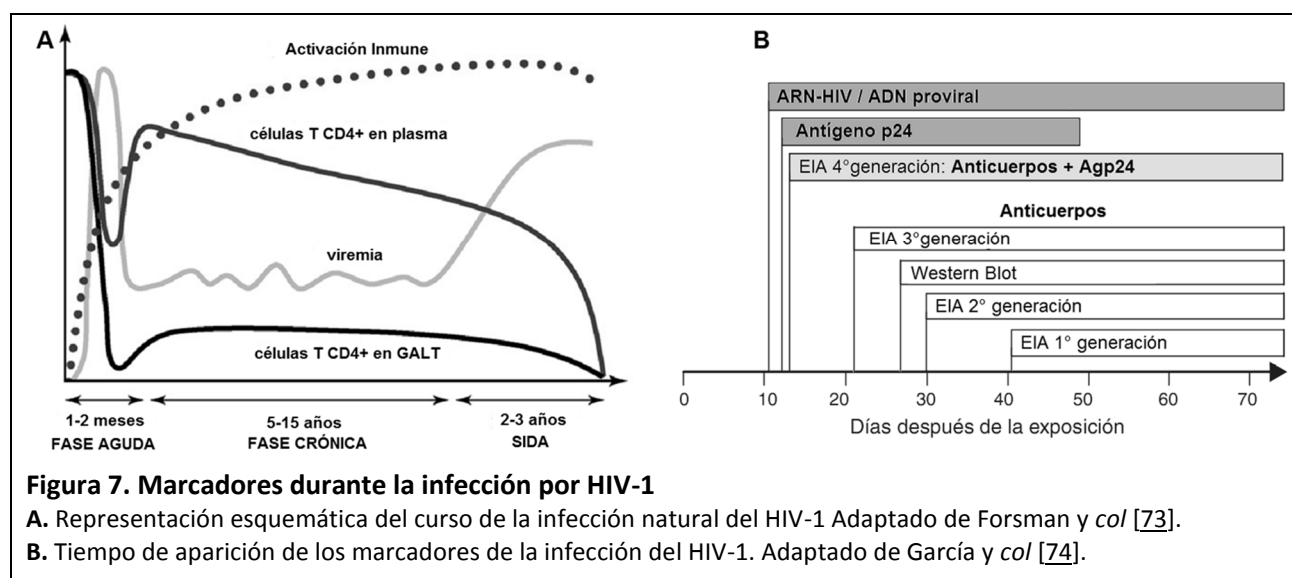
1.7 MARCADORES VIROLÓGICOS E INMUNOLÓGICOS DURANTE LA INFECCIÓN DEL HIV-1.

El curso de la infección natural del HIV-1 puede caracterizarse mediante una serie de marcadores virológicos e inmunológicos útiles tanto para el diagnóstico como para el seguimiento y el tratamiento de la infección (Figura 7A).

Como mencionamos previamente (Ítem 1.6.1), el **síndrome retroviral agudo** se produce durante la fase sintomática de la primoinfección, y presenta signos y síntomas difusos que duran entre 7 - 10 días. La

clave en el diagnóstico en esta fase se basa, por un lado, en la anamnesis y sospecha clínica por parte del médico, y por otro, en la realización de ensayos de laboratorio precisos y en el momento adecuado para garantizar la máxima sensibilidad diagnóstica. Sin embargo, la mayoría de los pacientes son diagnosticados durante la fase crónica de la infección dado que: *i)* cursan la fase aguda de forma asintomática (10 - 20% de los casos), *ii)* presentan síntomas pero no realizan una consulta médica (20 - 40% casos), o *iii)* consultan por síntomas, pero el médico no solicita los ensayos adecuados (40 - 50% de los casos) [72].

La cinética y los tiempos de aparición de los marcadores de infección (Figura 7B) son bastante consistentes entre los diferentes individuos, aunque se debe considerar que el tiempo exacto para su detección depende de diversos factores, tales como la sensibilidad del ensayo utilizado, las respuestas individuales del hospedero y las características de las variantes virales.



El tiempo acontecido entre el momento de la infección y la detección del ARN-HIV se denomina **periodo de eclipse**. En promedio, el **ARN-HIV** en plasma es el primer marcador en aparecer (Figura 7A), pudiéndose detectar en las primeras 2 semanas de la infección, alcanzando niveles de $10^9 - 10^{10}$ copias/ml a las 3 - 6 semanas [75]. Prácticamente al mismo tiempo se puede detectar el **ADN-HIV** integrado en el genoma celular (**ADN proviral**) a partir de células mononucleares de sangre periférica (PBMC, del inglés *Peripheral Blood Mononuclear Cells*), el cual permanecerá detectable de por vida. Los niveles de ARN-HIV disminuirán gradualmente por acción de la respuesta inmune adaptativa hasta alcanzar el estado de equilibrio o *set point*, a partir del cual la viremia se estabiliza en niveles de $10^5 - 10^6$ copias/ml [75]. El **antígeno p24** aparece en plasma a los 11 - 13 días de la infección (Figura 7B), y permanecerá detectable durante aproximadamente 45 días. El número de **células T CD4+** en plasma disminuye drásticamente en asociación con altos niveles de viremia (Figura 7A)[72, 75, 76].

Los **anticuerpos IgM específicos contra el HIV-1** aparecen generalmente dentro de las primeras tres semanas de la infección. Sin embargo, pueden no ser detectables en todos los individuos infectados. Los

anticuerpos IgG específicos contra el HIV-1 son detectables a las 3 – 6 semanas después de la infección dependiendo de las características del ensayo utilizado (Figura 7B), y sus niveles aumentan poco después de su aparición. Los primeros anticuerpos que suelen aparecer son los dirigidos contra el antígeno p24, la glicoproteína gp41 y la glicoproteína precursora gp160, mientras que el resto van emergiendo de modo progresivo en las semanas siguientes. Con la aparición de los anticuerpos específicos, los niveles del antígeno p24 disminuyen por la formación de inmunocomplejos. Al cabo de los 6 meses de infección más del 95% de las personas infectadas presentan **seroconversión**, es decir, reactividad en los ensayos de detección de anticuerpos en plasma o suero [75]. El tiempo transcurrido entre el momento de la infección y la detección de la seropositividad se denomina **periodo ventana serológico** (PVS), siendo variable entre los individuos infectados y dependiente de la vía de transmisión por la que se ha adquirido el HIV-1. En particular, los individuos infectados por vía transfusional seroconvierten antes que aquéllos infectados por vía sexual [74].

La aparición de los anticuerpos específicos y la respuesta celular citotóxica, dan inicio a la fase crónica de la infección y provocan: i) disminución de la viremia hasta alcanzar un estado de equilibrio, y ii) aumento en los niveles de las células T CD4⁺ en plasma a valores más bajos que los normales sugiriendo la persistencia de los efectos patogénicos asociados al HIV-1 [72]. En ausencia de HAART, la destrucción de la arquitectura del tejido linfóide y la activación crónica del sistema inmune conducen al descenso progresivo de los niveles plasmáticos de las células T CD4⁺ que determinarán el riesgo de aparición de infecciones oportunistas (Figura 7A). En la etapa final de la enfermedad caracterizada por la aparición del SIDA, los niveles de ARN-HIV en plasma aumentan, alcanzando valores similares a los observados en la fase aguda, a la vez que vuelve a detectarse el antígeno p24 en plasma o suero [72, 74].

1.8 DIVERSIDAD GENÉTICA DEL HIV-1.

1.8.1 ESTRUCTURA POBLACIONAL DE LA INFECCIÓN DEL HIV-1.

La capacidad de adaptación de los virus a los cambios abruptos producidos en el ecosistema virus-hospedero condiciona su supervivencia. La **variabilidad genética** es la principal estrategia evolutiva adoptada por los virus con genoma de ARN y es el resultado de la elevada cinética de propagación viral generada por un sistema de replicación propenso al error. Sin embargo, a pesar de ello, son capaces de mantener sus características esenciales en cuanto a las proteínas estructurales y funcionales del virión. La caracterización molecular de las primeras secuencias genómicas del HIV-1, en 1983, puso tempranamente en evidencia su extraordinaria diversidad.

Las alta tasa de error de la transcriptasa reversa ($1,4 \times 10^{-5}$ errores/pb/ciclo) [77], el corto tiempo de replicación genómica (1,2 días/ciclo) [66, 78] y el alto tamaño poblacional (5×10^9 viriones/día) [77], junto con la acción de la selección natural, configuran un sistema darwiniano extremo, en el que la velocidad

con la que se generan nuevas variantes supera la velocidad a la que se seleccionan [79]. Esta dinámica de mutación-selección rápida en virus con genomas de ARN conlleva necesariamente a la coexistencia de múltiples variantes en una población, que constituye un conjunto de individuos muy relacionados entre sí, pero no idénticos. A esta estructura poblacional se la conoce como **cuasiespecie viral** [80].

Las cuasiespecies virales son un importante reservorio genético de variantes estructurado por la acción de la mutación, la selección (positiva y negativa) y, en determinadas circunstancias, de la deriva genética y otros procesos estocásticos. La replicación con errores constituye, por tanto, un mecanismo evolutivo que proporciona a los virus la capacidad de permanecer en un medio continuamente cambiante [80]. Esta capacidad adaptativa se ha demostrado, entre otras, en las siguientes situaciones: *i*) evasión de la respuesta inmune, *ii*) evasión a agentes antivirales, *iii*) alteración del tropismo celular, y *iv*) alteración de la virulencia.

La capacidad replicativa o *fitness* de una variante viral es la contribución esperada de esa variante a la descendencia de la siguiente generación en un ambiente determinado. Cuanto mayor sea la variabilidad dentro de una población, mayor será la probabilidad de que existan y se seleccionen individuos mejor adaptados. Cuando al virus se le permite replicar con elevados tamaños poblacionales, se establece una competencia entre las diferentes variantes genéticas. En estas circunstancias, la selección positiva actúa seleccionando aquellas variantes de mayor *fitness* viral [81]. Si durante un nuevo proceso de infección, el tamaño poblacional efectivo se ve reducido drásticamente (cuello de botella poblacional), se puede producir la amplificación de sub-poblaciones de genomas, independientemente de su adaptación o ventaja selectiva en el entorno. Ello puede dar lugar a la selección de genomas con mutaciones no necesariamente adaptativas, en la secuencia consenso de la población viral [81].

1.8.2 BASES MOLECULARES DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA DEL HIV-1.

La dinámica de poblaciones virales parece seguir los mismos principios básicos de la genética de poblaciones clásica para organismos superiores [82], pudiéndose separar a los procesos que introducen variabilidad genotípica entre una generación y su descendencia en dos grupos: *i*) procesos de generación de mutantes durante la replicación viral, gobernados fundamentalmente por procesos estocásticos, y *ii*) procesos ajenos a la replicación, tales como la expansión de la progenie viral de una célula al resto del organismo hospedador, la probabilidad de co-infección de una célula por dos virus, o la expansión desde un organismo a otros.

En HIV-1, la diversidad genética en las cuasiespecies virales se asocia con la persistencia viral frente a la presión inmune, el fracaso de la HAART por desarrollo de resistencias, y el retraso en el desarrollo de una vacuna efectiva. La medida de esta diversidad genética poblacional viral depende de un conjunto complejo de factores, siendo los mecanismos principales la mutación y la recombinación [83].

1.8.2.1 Diversidad por mutaciones en el HIV-1.

Para el HIV-1, la mayoría de las mutaciones surgen a través los errores introducidos por la enzima RT o de las acciones de factores mutagénicos intrínsecos de la célula, tales como APOBEC3G [23]. Las estimaciones actuales indican que se introduce, aproximadamente, una mutación por cada tres genomas virales con una tasa de mutación de $1,4 \times 10^{-5}$ errores/pb/ciclo [84]. Sin embargo, estas mediciones no consideran:

- i) los bajos niveles de dNTPs presentes en las células T CD4⁺ activadas, que conducen al aumento en al menos dos veces de las tasas de mutación para el HIV-1 [85, 86].
- ii) la presencia de dUTP en exceso en las células diferenciadas (macrófagos), el cual puede ser incorporado erróneamente en el ADN viral por la incapacidad de la RT retroviral de distinguir entre dTTP y dUTP [87].

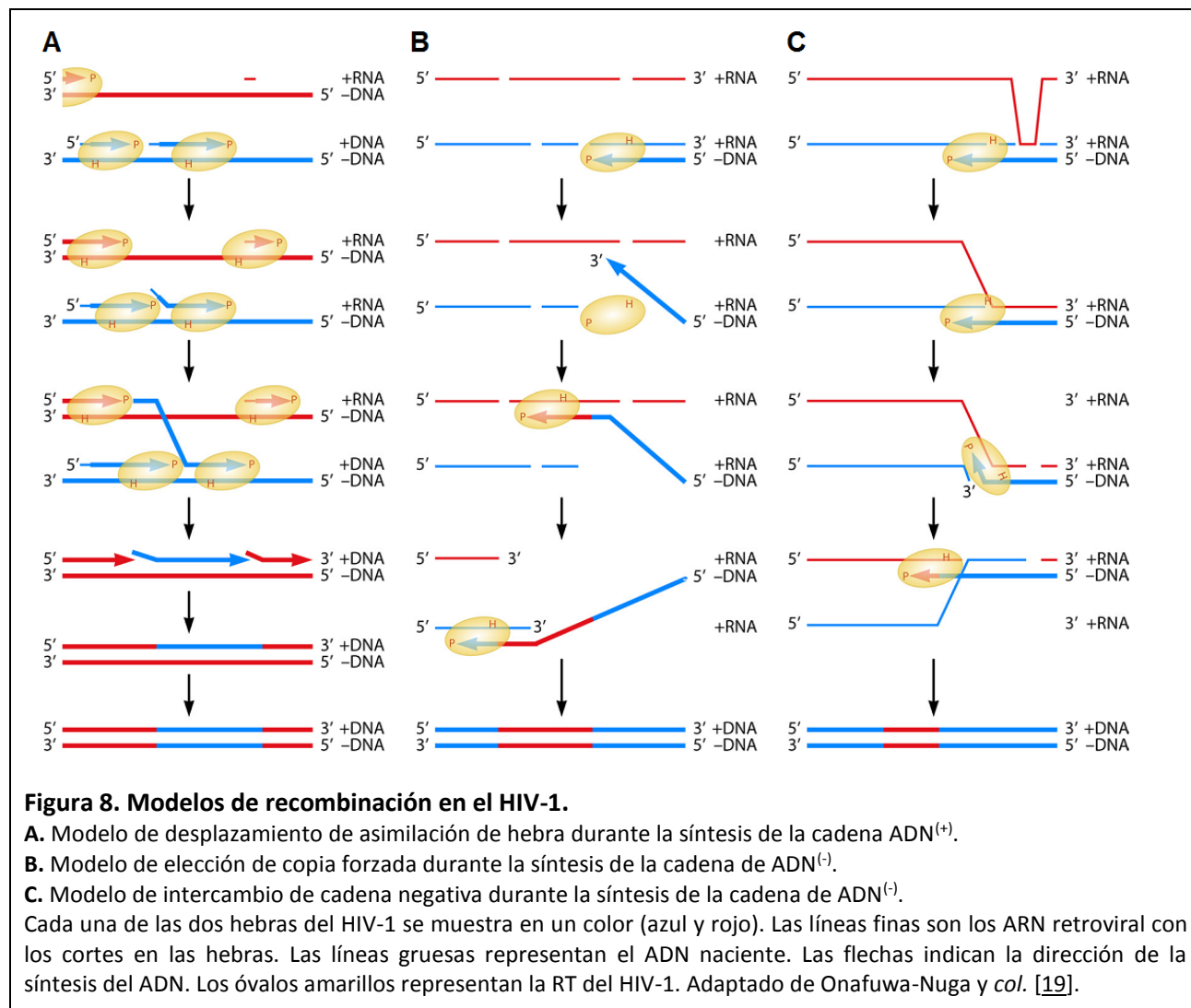
1.8.2.2 Diversidad por recombinación en el HIV-1.

Como descrito anteriormente (Ítem 1.5.2.1 y Figura 5), la síntesis del ADN doble hebra lineal conduce obligatoriamente a dos “**transferencias de hebra**” para la generación de las LTRs, las cuales se producen en posiciones definidas del genoma y pueden ser inter- o intra-hebra (Figura 5, etapas C y F). Además de este proceso, durante la replicación, la enzima RT puede comenzar la síntesis en una de las dos cadenas de ARN genómico viral, y disociarse para seguir la síntesis utilizando la otra cadena viral como molde, generando así cadenas de ADN recombinantes que transportarán información de ambas hebras parentales. En el HIV-1 se estima que la frecuencia de recombinación es mayor a la de mutación [77], convirtiéndose en una fuente importante de variabilidad genética, ya que: i) provee un mecanismo para contrarrestar la desventaja asociada a las altas tasas de mutación, y ii) permite explorar nuevas combinaciones genéticas procedentes de virus parentales de origen distinto.

Diversos estudios sugieren que la recombinación en el HIV-1 resulta por el mecanismo de elección de copia [19], es decir, la utilización alternativa de alguna de las hebras de ARN molde durante la síntesis de la cadena positiva (ADN⁽⁺⁾) y/o negativa (ADN⁽⁻⁾). El **modelo de “desplazamiento de asimilación de hebra”** (*strand displacement-assimilation*) propone que la recombinación ocurre durante la síntesis del ADN⁽⁺⁾ a través de estructuras intermediarias formadas por dos segmentos de ADN de doble cadena conectados por un fragmento de ADN de cadena simple (estructura H) (Figura 8A). Sin embargo, no se puede descartar que el proceso de recombinación se produzca a partir de la síntesis del ADN⁽⁻⁾, lo cual puede suceder a través de dos mecanismos:

- **elección de copia forzada** (*forced copy-choice*): las cadenas de ADN⁽⁻⁾ nacientes se disocian del ARN genómico cuando la RT encuentra rupturas en el molde, promoviéndose la asociación con regiones homólogas en la otra cadena de ARN viral (Figura 8B).

- **intercambio de cadena negativa** (*minus-strand exchange*): la degradación del ARN molde por la actividad ARNasa H de la RT expone segmentos de ADN⁽⁻⁾ de una de las cadenas del ARN genómico que pueden aparearse con regiones complementarias de la otra cadena de ARN genómico (Figura 8C) [19].



En el HIV-1, la recombinación puede ocurrir entre diferentes variantes del mismo subtipo (recombinación intra-subtipo), diferentes subtipos (recombinación inter-subtipo), o diferentes grupos (recombinación inter-grupo). La generación de estos virus recombinantes requiere que un individuo esté infectado por más de una variante viral (**infección dual** o **infección múltiple** si hay más de dos variantes implicadas) y que dos viriones infecten una misma célula [19]: i) de forma simultánea en único evento de transmisión o **coinfección** (Figura 9B) o ii) de forma secuencial en múltiples eventos de transmisión o **superinfección** (Figura 9A). Si bien, hace más de una década que se demostró que la superinfección es relativamente frecuente entre las personas que participan en conductas de alto riesgo [88, 89], la tasa de superinfección en la población general fue determinada recientemente (1,44 por cada 100 personas al año) la cual fue comparable a la tasa anual estimada de nuevas infecciones por HIV-1 para la cohorte de estudio [90], haciendo que este mecanismo de diversidad adquiriera relevancia.

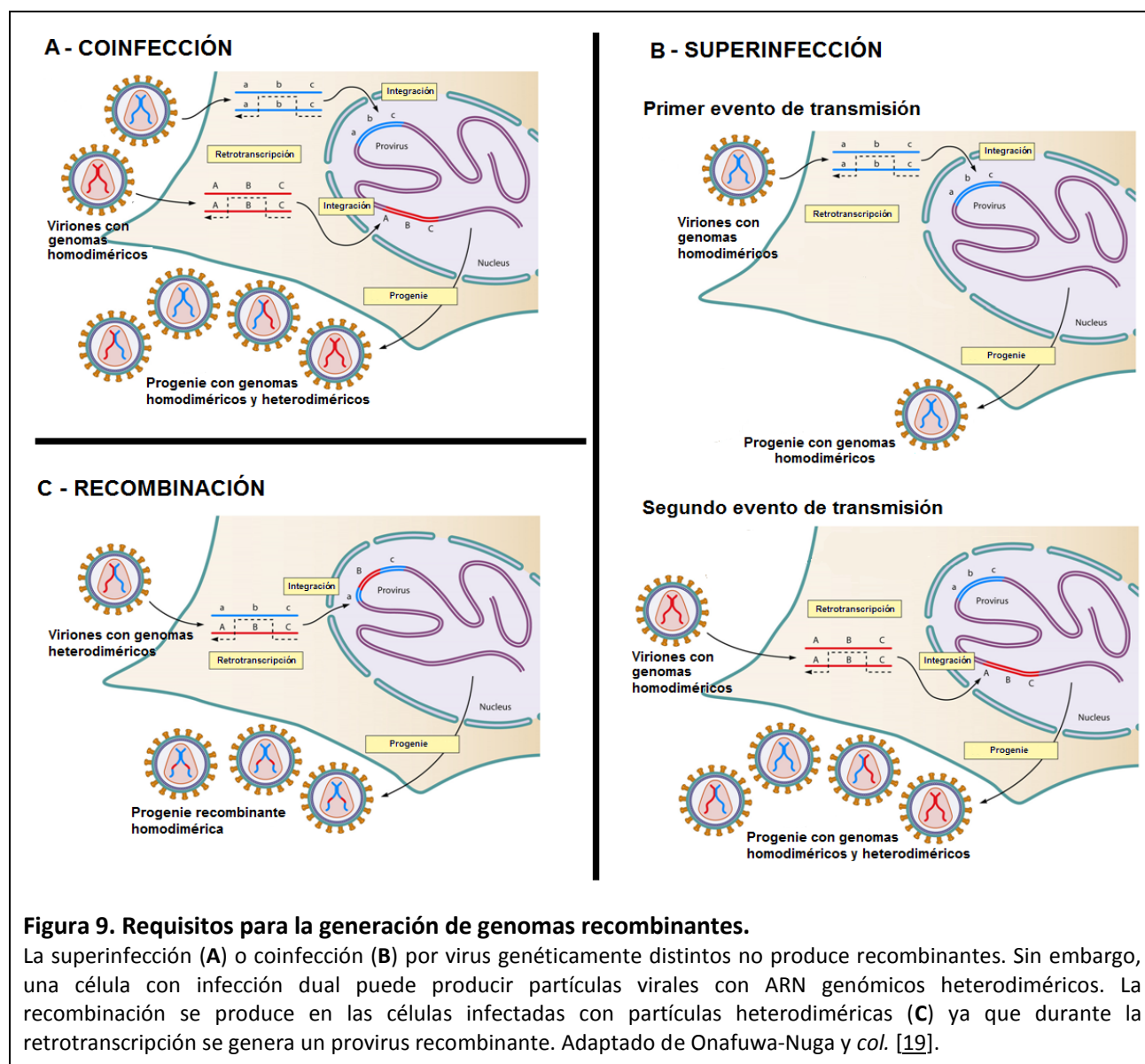


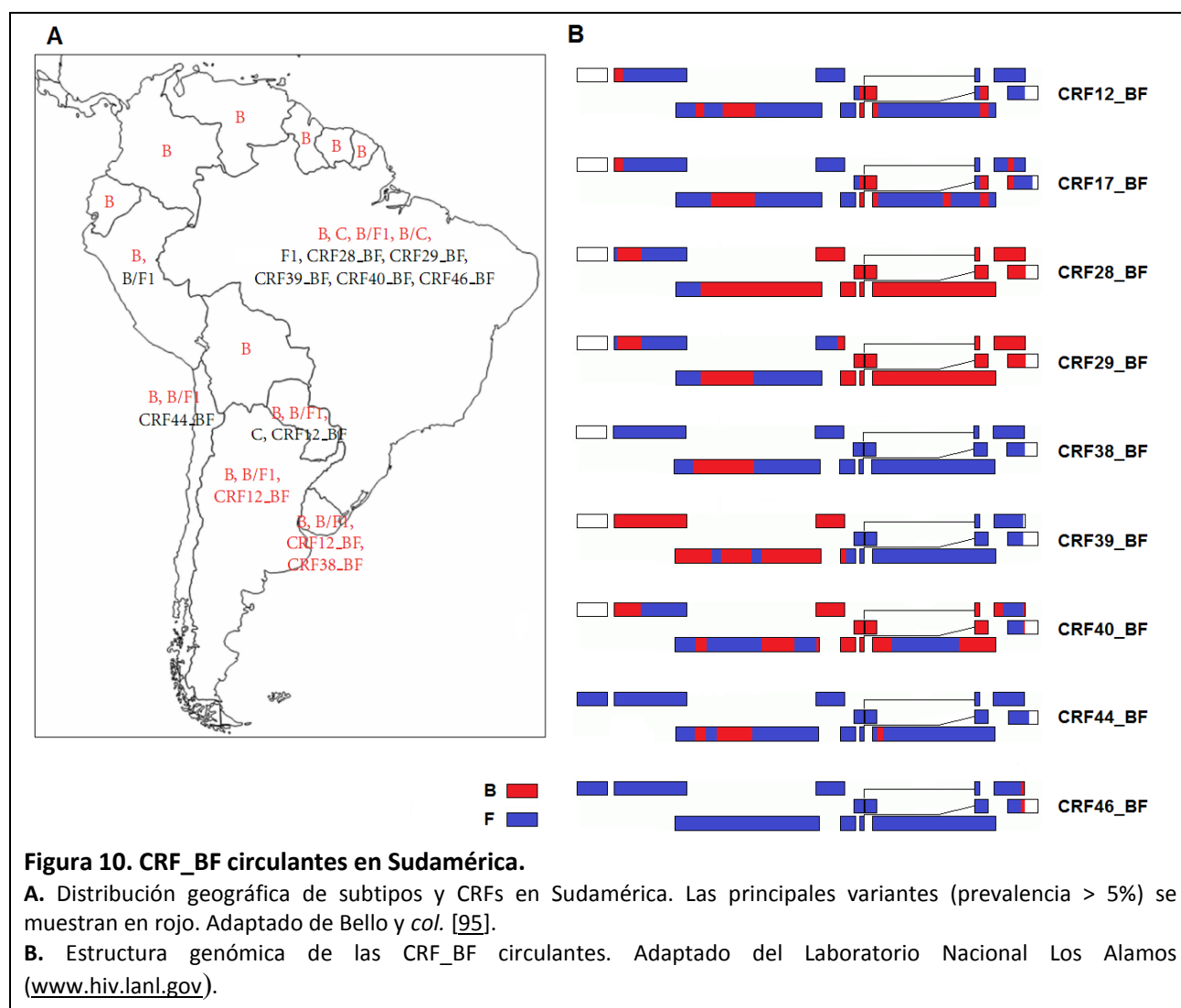
Figura 9. Requisitos para la generación de genomas recombinantes.

La superinfección (A) o coinfección (B) por virus genéticamente distintos no produce recombinantes. Sin embargo, una célula con infección dual puede producir partículas virales con ARN genómicos heterodiméricos. La recombinación se produce en las células infectadas con partículas heterodiméricas (C) ya que durante la retrotranscripción se genera un provirus recombinante. Adaptado de Onafuwa-Nuga y col. [19].

La importancia de la recombinación en la conformación de la diversidad global del HIV-1 radica principalmente en la recombinación inter-subtipo, generando formas recombinantes estables que se han extendido geográficamente. Aunque, la primera evidencia de recombinación en HIV-1 fue sugerida en 1988 en una secuencia viral aislada de un paciente africano [91], el reconocimiento de la importancia de la recombinación en la conformación de la diversidad en la pandemia mundial se evidenció en 1994 con la detección de la primera recombinante inter-subtipo BF en individuos infectados de Brasil [92]. El desarrollo y la mayor disponibilidad de métodos de secuenciación nucleotídica permitieron en los años subsiguientes la descripción de múltiples recombinantes entre subtipos virales. En 1999, se establecieron los criterios de definición y nomenclatura de estas recombinantes [93]. Así, se define como **forma recombinante circulante** (CRF, del inglés *Circulating Recombinant Form*) cuando el virus, con estructuras de mosaico coincidentes, fue aislado de 3 o más pacientes infectados sin una relación epidemiológica directa entre sí y se designan con números consecutivos de acuerdo con el orden de descubrimiento,

seguido de los subtipos parentales (por ejemplo, CRF12_BF) o la sigla *cpx* si se encuentran más de tres subtipos parentales que formen la CRF (por ejemplo, CRF18_cpx, conformada de 6 subtipos: A1, F, G, H, K, U). Si no se cumple este requisito, es decir, que la cepa recombinante se aísla de un solo individuo o de un grupo epidemiológicamente relacionado entre sí, se la clasifica como **forma recombinante única** (URF, del inglés *Unique Recombinant Form*). En la actualidad se han descrito globalmente 61 CRFs (Anexo 1) y centenares de URFs del HIV-1. Las formas recombinantes se han generalizado y se estima que actualmente son responsables de más del 20% de las infecciones por HIV-1 en todo el mundo [34].

Las variantes de HIV-1 presentan una distribución geográfica precisa (www.hiv.lanl.gov), con excepción del África Subsahariana, donde se encuentran representados prácticamente todos los subtipos, las CRFs y las URFs descritas. En general, en los países de Centroamérica y Sudamérica persiste un marcado predominio del subtipo B del HIV-1, aunque en los últimos años se ha incrementado la prevalencia de las recombinantes BF/BF1, algunas de las cuales circulan desde 1980 [94]. La caracterización genética de estas recombinantes BF/BF1 reveló diferencias importantes entre los países (Figura 10).



En Brasil, se han descritos 6 CRFs (CRF28_BF, CRF29_BF, CRF31_BC, CRF39_BF, CRF40_BF, y CRF46_BF), aunque la epidemia está dominada por una amplia variedad de URFs que no comparten un ancestro común recombinante [96]. En Argentina, la epidemia comprende mayormente a la CRF12_BF, CRF17_BF y al menos 26 URFs con una estructura relacionada a la CRF12_BF [97], y una marcada diferencia en la prevalencia en función de la vía de transmisión: mientras que en la población de hombres que tienen sexo con hombres predomina el subtipo B, en los usuarios de drogas endovenosas e infectados por transmisión heterosexual se han diseminado las recombinantes BF [98]. En Uruguay y Chile, se han descrito las CRF38_BF y CFR44_BF, respectivamente. Sin embargo, los estudios sugieren que las recombinantes BF/BF1 que circulan predominantemente en estos países, al igual que en Bolivia y Paraguay, son similares a las descritas en la Argentina [99-101].

1.9 METODOLOGÍA PARA LA DETECCIÓN DE LOS MARCADORES DE INFECCIÓN DEL HIV-1.

1.9.1 ENSAYOS INMUNOLÓGICOS: Detección de anticuerpos o antígenos virales.

La infección por el HIV-1 se puede determinar con alta sensibilidad diagnóstica mediante el empleo de ensayos que detectan la presencia de anticuerpos específicos en plasma (***ensayos de tamizaje o screening***), ya que se encuentran presentes en prácticamente el 100% de los individuos infectados por el virus. Estos ensayos poseen alta sensibilidad a fin de minimizar la aparición de falsos negativos metodológicos, y son capaces de detectar anticuerpos de baja avidéz por el antígeno, que son principalmente los que se producen en las fases tempranas de la infección [76]. La probabilidad de un resultado falso positivo es mayor cuanto más baja es la prevalencia de la infección en la población estudiada. Por ello, el criterio habitual empleado por los laboratorios es utilizar dos ensayos de screening en el testeo inicial.

La amplia variedad de ensayos de *screening* disponibles en la actualidad se basan en el principio de la unión altamente específica del antígeno – anticuerpo y son de gran utilidad en el diagnóstico de la fase crónica de la infección del HIV-1. Las técnicas de enzimoimmunoensayos (EIA, del inglés *Enzyme Immunoassay*) son los más extensamente empleadas debido a su simplicidad, alta sensibilidad, posibilidad de automatización y diseño para analizar un gran número de muestras de forma simultánea. Los EIA donde los antígenos son inmovilizados sobre una fase sólida se denominan ELISA (del inglés *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) y fueron los primeros en ser desarrollados para la detección de anticuerpos específicos contra el HIV-1 [75]. La calidad diagnóstica del ELISA depende principalmente de 3 factores: *i*) la adecuada selección del valor de corte o *cut-off* (VC), *ii*) la base antigénica utilizada para captura de los anticuerpos específicos presentes en la muestra, y *iii*) la capacidad de detectar los distintos tipos de anticuerpos específicos (IgM, IgG e IgA) [75].

Cualquier resultado positivo obtenido por pruebas de ELISA debe ser confirmado por **ensayos de confirmación o suplementarios**. Entre ellos, el más ampliamente utilizado es el Western Blot (WB) que utiliza proteínas virales provenientes de lisados de cultivos virales. El WB detecta los anticuerpos dirigidos contra las proteínas de envoltura (gp160, gp120 y gp41), las proteínas estructurales (p55, p24 y p17) y las enzimas virales (p66, p51 y p31) del HIV-1, y al menos una proteína de envoltura del HIV-2. Cada equipo comercial disponible contiene instrucciones precisas sobre la interpretación de los resultados según criterios de positividad más o menos restrictivos. Cualquier reactividad que no reúna el criterio de positividad establecido por el fabricante se considera un resultado indeterminado, siendo conflictiva su interpretación y requiriendo una evaluación en base a la historia clínica del paciente, las prácticas de riesgo y a la posibilidad de una infección reciente por el HIV. El Centro para el Control de Enfermedades de los EE.UU. (CDC, del inglés *Centers for Disease Control and Prevention*) recomienda realizar un seguimiento de 6 meses en casos de WB indeterminados, de forma tal que si el patrón de bandas reactivas se mantiene estable, el resultado puede ser considerado negativo en individuos sin sintomatología y bajo riesgo de infección [102].

El diagnóstico durante la primoinfección es posible a través de: i) la identificación de antígenos virales (**antígeno p24**), o ii) la detección de los ácidos nucleicos virales (**ARN-HIV** o **ADN proviral**).

Mientras la búsqueda de anticuerpos específicos indica contacto o exposición al virus e infección, la detección del antígeno p24 en plasma (**antigenemia p24**) aporta información sobre el estado actual de la infección convirtiéndose en un indicador de replicación viral [103]. Los métodos de detección de la antigenemia p24 son fundamentalmente técnicas de ELISA de “captura de antígeno” con una etapa previa de disociación con tratamiento ácido o básico para liberar al antígeno p24 de los inmunocomplejos circulantes [104]. Este procedimiento aumenta la sensibilidad del ensayo (cerca al 60%) en pacientes pediátricos y en pacientes asintomáticos con infección reciente. En los últimos años surgieron ensayos ELISA de cuarta generación que permiten detectar simultáneamente los anticuerpos específicos y el antígeno p24, permitiendo obtener un resultado positivo a los 13 - 15 días después de la infección (Figura 7B). La introducción de estas técnicas modificó la definición del PVS considerándose ahora como el periodo de tiempo que transcurre desde el momento de la infección a la aparición de un resultado positivo por métodos inmunológicos [75].

1.9.2 ENSAYOS MOLECULARES: Detección de ácidos nucleicos virales.

La detección del ADN proviral en PBMC por medio de técnicas de amplificación *in vitro*, como la **reacción en cadena de la polimerasa** (PCR, del inglés *Polymerase Chain Reaction*), resultó de gran utilidad para el diagnóstico temprano de la infección en neonatos con riesgo de transmisión vertical [75]. Se considera como la determinación de referencia a la hora de utilizar los métodos moleculares para el diagnóstico de la infección por HIV, ya que demuestra la presencia de virus integrado en el genoma

celular. Actualmente la detección del ADN proviral está siendo reemplazada por la del ARN-HIV en plasma, debido a la mayor sencillez en la obtención y procesamiento de la muestra (PBMC vs. plasma) y a las dificultades de disponer de ensayos comerciales para su determinación, que dispongan de los controles de calidad adecuados y de la certificación de agencias reguladoras.

La **determinación cuantitativa del ARN-HIV en plasma o carga viral plasmática** (CVP) refleja los niveles circulantes de HIV-1 en sangre periférica, fluctúa en relación directa con la producción viral y se expresa en número de copias del ARN-HIV por mililitro de plasma [105]. Su utilidad radica en el monitoreo de la respuesta a la HAART, en la estimación del pronóstico de la infección y en la toma de decisiones terapéuticas. La CVP no debería emplearse con fines diagnósticos, ya que su desarrollo y validación refieren a muestras de individuos con diagnóstico previo de infección.

Aunque el diagnóstico de la infección por el HIV se establece mediante la detección de anticuerpos específicos contra el virus, el uso de técnicas moleculares para la **determinación cualitativa del ARN-HIV en plasma** es necesaria en situaciones especiales como: *i)* diagnóstico de infección en neonatos nacidos de madres seropositivas, *ii)* definición del estado de infección en individuos con patrones serológicos atípicos, y *iii)* reducción del PVS para aumentar la seguridad transfusional de componentes sanguíneos [75].

1.9.3 DETERMINACIÓN CUALITATIVA DEL ARN-HIV Y VARIABILIDAD GENÉTICA.

Diversos métodos moleculares comerciales se han desarrollado para la determinación cualitativa del ARN-HIV, principalmente para su utilización en el tamizaje de donantes de sangre (Tabla 1), los cuales difieren en las estrategias metodológicas de amplificación, tiempos de realización y capacidad de procesamiento [105].

Tabla 1. Métodos comerciales licenciados por la FDA (EE.UU.) para la detección cualitativa del ARN del HIV-1.

NOMBRE	FORMATO	EMPRESA O LABORATORIO	FECHA DE APROBACIÓN
COBAS® AmpliScreen HIV-1 Test v 1.5 [#]	RT-PCR	Roche Molecular Systems	23/05/2007
Procleix® HIV-1/HCV	TMA	Gen-Probe, Inc (Novartis)	04/06/2004
Procleix® Ultrio	TMA	Gen-Probe, Inc (Novartis)	03/10/2006
Procleix® Ultrio Plus ^{&}	TMA	Gen-Probe, Inc (Novartis)	25/05/2012
COBAS® TaqScreen MPX Test	RT-qPCR	Roche Molecular Systems Inc.	30/12/2008

RT-PCR: retrotranscripción + reacción en cadena de la polimerasa. TMA: *Transcription-Mediated Amplification*.

RT-qPCR: retrotranscripción + reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real. Adaptado de FDA [106].

[#] En abril de 2008, el sistema fue reemplazado por la plataforma automatizada COBAS® s201.

[&] En mayo de 2007, el sistema se automatizó a la plataforma Procleix Tigris System.

Sin embargo, un problema con los ensayos comerciales para la detección del ARN del HIV-1 es que la validación de los mismos se ha llevado a cabo sobre muestras de individuos infectados con el subtipo B,

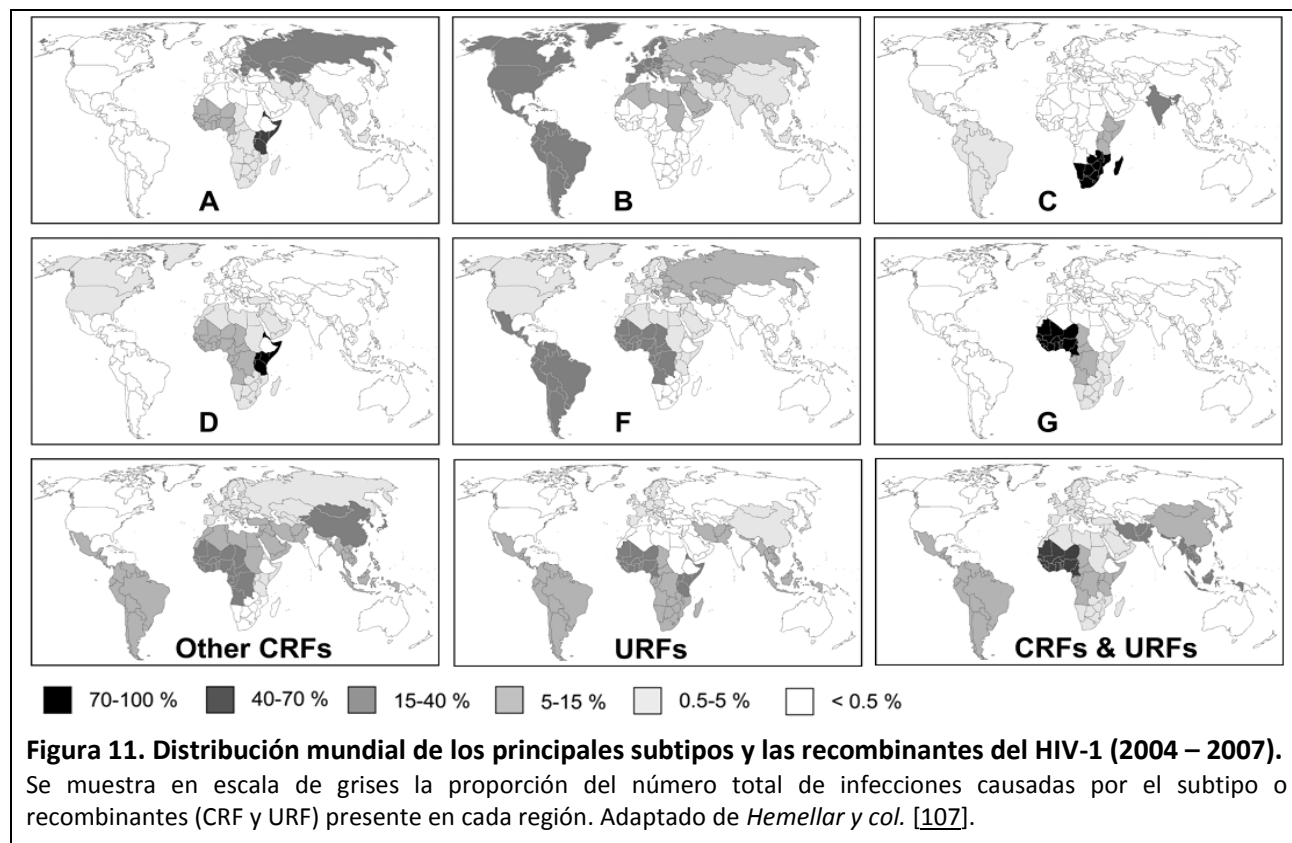
que es el subtipo predominante en los países desarrollados. Debido a la amplia diversidad genética del HIV-1, las distintas empresas biotecnológicas extendieron la validación de sus ensayos al resto de los subtipos y CRFs de mayor circulación mundial, pero utilizando un número restringido de muestras [20, 77]. Dada la dinámica poblacional del HIV-1, existen distintos subtipos y CRFs que son tan importantes, desde una perspectiva regional, como el subtipo B.

Hemellar y col. estimaron que, a nivel global, el subtipo C es el responsable de casi la mitad de las infecciones (48%), seguido del subtipo A (12%), el subtipo B (11%), la CRF02_AG (8%), la CRF01_AE (5%), el subtipo G (5%) y el subtipo D (2%). El resto de los subtipos del HIV-1 (F, H, J y K) representan menos del 1%. En conjunto, las distintas recombinantes son responsables del 20% de las infecciones, correspondiendo el 16% a las CRFs [107]. En la Figura 11 se esquematiza la distribución de los distintos subtipos y recombinantes (CRFs y URFs) en el mundo. La mayoría de las infecciones del subtipo C está presente en el sur de África y la India, el subtipo A en el este de África, Europa del Este y Asia Central, mientras que la epidemia de subtipo B es la más amplia y con la distribución más uniforme. Las distintas CRFs y URFs están distribuidas selectivamente otorgándole a la epidemia en cada región geográfica una dinámica particular [107]. En efecto, un estudio reciente realizado sobre 553 individuos infectados con HIV-1, reportó que 11 de ellos estaban infectados con una nueva recombinante BF que presentaba mutaciones en las regiones donde hibridan los cebadores y sondas utilizados en el ensayo comercial empleado para detectar ARN de HIV-1 [108]. Estos hallazgos permitieron explicar la causa del mal desempeño del test al ser aplicado en el tamizaje molecular de donantes de sangre cuando se encontraban en periodo de seroconversión [108] y refuerzan la necesidad de disponer de ensayos desarrollados a la medida de la epidemia regional para evitar resultados falsamente negativos.

Los métodos comerciales licenciados por la FDA para la detección cualitativa del ARN del HIV-1 en el tamizaje de donantes de sangre (Tabla 1) [106] se encuentran disponibles a nivel mundial en laboratorios de referencia de Bancos de Sangre (BS) centralizados que cuentan con apoyo financiero de distintos organismos nacionales e internacionales. Sin embargo, los hospitales públicos y sanatorios locales de los países en desarrollo carecen de la infraestructura básica necesaria requerida y exigida por las empresas biotecnológicas para la implementación de estos métodos, así como del número de muestras mensuales necesarias para que el costo del ensayo y la logística sea económicamente viable.

Debido a los altos costos de las pruebas comerciales para la detección temprana del ARN-HIV, la limitada disponibilidad de distribuidores regionales de las empresas fabricantes, el requisito de personal calificado, la necesidad de instalaciones adecuadas, la dificultad en la adquisición apropiada de reactivos y servicio técnico para el mantenimiento de los equipos específicos, sería sumamente útil disponer de ensayos regionales caseros o “*in house*” que se adecuen a las características particulares de la epidemia en la zona de implementación. En base a esto, y teniendo en cuenta que, de las técnicas utilizadas por las empresas biotecnológicas para la amplificación de ARN de HIV-1 (Tabla 1) la RT-PCR es la más versátil y

difundida, varios laboratorios han desarrollado sistemas “*in house*”, de menor costo, cuyos resultados se correlacionan satisfactoriamente con los equipos comerciales [109, 110] e incluso pueden tener un mejor desempeño si son diseñados en base a las cepas virales circulantes en la región.



Considerando que la prevalencia de las infecciones por HIV-1 en países con recursos limitados es casi siempre más alta que en los países desarrollados, se pueden esperar más casos de detección del ARN viral durante el PVS entre los donantes de sangre [111].

1.10 SEGURIDAD TRANSFUSIONAL Y TAMIZAJE MOLECULAR DE DONANTES.

La transfusión sanguínea es un procedimiento médico terapéutico que tiene como objetivo corregir la deficiencia de un componente específico de la sangre en un paciente, ya sea en lo que respecta a la capacidad de transporte de oxígeno (componente eritrocitario) o en relación a la función hemostática (plaquetas y/o factores de coagulación).

Las **infecciones virales transmisibles por transfusión** son una complicación de gran importancia en relación con la morbi-mortalidad que ocasiona en los receptores de sangre e implica un altísimo impacto socio-económico en la comunidad. La trascendencia de la infección radica en que donantes aparentemente sanos pueden tener infecciones, sobre todo virales, las cuales frecuentemente no disponen de tratamientos específicos.

Afortunadamente, las infecciones virales transmitidas por transfusión han disminuido drásticamente en las últimas dos décadas, debido, en parte, al desarrollo de ensayos de alta sensibilidad y especificidad para el tamizaje serológico de la sangre de donantes [112]. A pesar de este avance existe un riesgo residual de infección por transfusión que puede ser estimado en base a cuatro factores: i) el PVS, ii) el tipo de virus y de cepas involucrados en la infección, iii) las seroconversiones atípicas, y iv) los eventuales errores de laboratorio. Como se muestra en la Tabla 2, las donaciones efectuadas durante el PVS constituyen el riesgo residual de infección predominante para los tres agentes virales transmisibles por transfusión más importantes debido a la presencia de viremia antes de la seroconversión: el Virus de la hepatitis C (HCV, del inglés *Hepatitis C Virus*), el HIV-1 y el Virus de la hepatitis B (HBV, del inglés *Hepatitis B Virus*) [113].

Tabla 2. Factores que afectan el riesgo residual de Infección para HCV, HIV-1 y HBV [114].

Agente viral	PVS	Cepas virales	Seroconversiones atípicas	Error de laboratorio
HCV	72,1 - 87,9%	< 1,1%	< 21,9%	< 21,9%
HIV-1	93,7%	< 3,7%	< 0,6%	2,5%
HBV	41,2 - 98,0%	0	0,6 - 1,5%	0,6 - 4,5%

Los casos de exposición nosocomial, tales como la exposición laboral o por transfusiones con sangre contaminada, han sido utilizados para determinar el curso de las infecciones ya que en éstos el tiempo de exposición al virus y la seroconversión pueden ser documentados. El análisis de estos casos permitió estimar el PVS para los virus de alto impacto clínico: de 69 días para el HCV [115], 59 días para el HBV [116] y 22 días para el HIV-1 [117].

Estos hallazgos condujeron al desarrollo de la **Tecnología de Amplificación de Ácidos Nucleicos** (NAT, del inglés *Nucleic Acid Testing*) para el tamizaje de donantes, la cual aumentaría la seguridad transfusional al disminuir la incidencia de infecciones virales transmitidas por transfusión. La implementación de la metodología NAT permitió reducir el periodo ventana, con respecto al PVS, en 14 días para el HIV-1, en 21 días para el HCV y en 45 días para el HBV [114].

La utilización del NAT para el tamizaje de donantes fue formalmente considerada luego que la FDA reportara diversos casos de infección por el HCV por el uso de inmunoglobulina intravenosa manufacturada por la *Baxter Healthcare Corporation* [118]. Este hemoderivado provenía de plasmas de donantes que habían resultado positivos al ARN-HCV y que presentaban anticuerpos IgG anti-HCV negativos. Este episodio definió una serie de requerimientos para todos los productos manufacturados sin procedimientos de inactivación viral que luego se hizo extensivo a todos los productos medicinales derivados del plasma [119]. La implementación de esta recomendación requirió el desarrollo en paralelo de estándares apropiados que permitieran valorar los ensayos moleculares disponibles de manera homogénea. De acuerdo a estas pautas, a finales de los '90, la Organización Mundial de la Salud (OMS)

estableció un estándar de ARN-HCV [120] y uno de ARN-HIV-1 [121], como resultado de un estudio colaborativo con el Instituto Nacional de Estándares y Controles Biológicos (NIBSC, del inglés *National Institute for Biological Standards and Control*) del Reino Unido. Posteriormente, se desarrollaron estándares para el ADN-HBV [122] y el ADN del Parvovirus B19 [123].

Los elevados costos de la implementación de NAT llevaron a los laboratorios a implementar, en sus inicios, el tamizaje de los donantes en *pooles* de muestras. Con motivo de esto, en 1999, la Agencia de Evaluación de Medicamentos Europea (EMA, del inglés *European Medicines Agency*) normatizó que los ensayos para la detección del ARN-HCV debían contar con una sensibilidad de al menos 100 UI/ml, mientras que el Instituto *Paul Ehrlich* recomendó una sensibilidad de al menos 5.000 UI/ml por donación individual. Para los BS que también llevan a cabo la detección del ARN del HIV-1 en *pooles*, el Instituto *Paul Ehrlich* propuso un límite de detección de 10.000 copias/ml por donación individual [124, 125]. Con respecto a las normativas en EE.UU, la FDA recomendó el uso de ensayos con un límite de detección de por lo menos 100 UI/ml para el HCV y 100 copias/ml para HIV-1, y una sensibilidad de 5.000 UI/ml para el HCV y 5.000 copias/ml para HIV-1 por donación en el 95% de las réplicas cuando se lleva a cabo en *pooles* de plasma [126].

Si bien la infección por el HCV es la que presenta mayor PVS, la epidemia de HIV/SIDA fue la que tuvo más impacto en el desarrollo de los sistemas NAT. En nuestro país, entre los años 2001 y 2012, se notificaron 227 casos de transfusiones con sangre contaminada con HIV-1 [127], y existieron al menos 6 juicios con sentencia final vinculados con la transmisión de HIV-1 por vía transfusional en PVS. Hasta el año 2007, en aquellos juicios con fallo favorable para el demandado, el argumento que sentó jurisprudencia fue la no existencia de pruebas de mayor sensibilidad que la detección de anticuerpos específicos y antígenos virales al momento del hecho. Sin embargo, en la actualidad esta situación no tiene vigencia, ya que la Administración Nacional de Medicamentos y Tecnología Médica (ANMAT) ha aprobado en el país dos de los sistemas NAT que se comercializan mundialmente [128]: COBAS® *AmpliScreen* HIV-1 Test v 1.5 validado para *pooles* de 6 muestras y *Procleix*® *Ultrio* para el testeo en muestras individuales de plasma.

La mayoría de los sistemas NAT licenciados y disponibles comercialmente para el tamizaje del HIV en donantes de BS (Tabla 1) pueden aplicarse en *pooles* de plasmas debido a su alta complejidad y elevados costos (COBAS® *AmpliScreen* HIV-1 Test v1.5 y COBAS® *TaqScreen* MPX Test en *pooles* 96 muestras, y *Procleix*® HIV-1/HCV y *Procleix*® *Ultrio Plus* en *pooles* 16 muestras), mientras que solo el *Procleix*® *Ultrio* se ensaya sobre muestras individuales [129]. En la mayoría de los países desarrollados, los laboratorios que realizan el tamizaje de donantes incorporaron progresivamente la metodología NAT como un método de rutina utilizando desarrollos “*in house*”, ensayos comerciales o adaptaciones de estos últimos [114]. Todos los sistemas NAT deben ser validados por los laboratorios antes de su implementación, considerando los lineamientos establecidos por las instituciones de referencia [14, 126].

1.10.1 MARCO REGULATORIO Y APLICACIÓN DEL NAT EN NUESTRO PAÍS.

Se entiende por sangre segura aquella que cumple con los requisitos establecidos por las autoridades reguladoras nacionales para su uso en transfusiones y/o en la elaboración de componentes derivados de la sangre. En nuestro país, la Ley Nacional de Sangre N° 22.990 de 1983, y su Decreto Reglamentario 1.338/2004 [130], estableció el Sistema Nacional de Sangre y el Organismo Rector General dependiente del Ministerio de Salud de la Nación. Sin embargo, la ausencia de un marco integrado de aplicación generó un sistema caracterizado por la constante proliferación de BS atomizados (cerca de 300 en el sector oficial) [131], generalmente ligados a hospitales o sanatorios, sin recursos para hacer frente a las crecientes exigencias de la seguridad transfusional, especialmente luego del impacto causado por la epidemia del HIV/SIDA. Desde el 2002 en que fue aprobado el Plan Nacional de Sangre (Resolución N° 70/02) [132], se han incorporado numerosos conceptos para una mejor organización de la Red de Servicios de Hemoterapia y otros avances para el Sistema de Sangre, como la creación del Registro de Servicios de Hemoterapia en 2008. El marco regulatorio nacional establece que toda unidad de sangre debe ser estudiada en: i) el laboratorio de Inmunohematología para determinación de grupo y factor sanguíneo y de anticuerpos irregulares, y ii) el laboratorio de Inmunoserología donde se realizan las pruebas para la detección de las infecciones transmisibles por transfusión, siendo obligatorias para nuestro país las provocadas por HBV, HCV, HIV-1/2, Chagas, Sífilis, HTLV-1/2 y Brucelosis [133].

La implementación de los sistemas NAT en el ámbito público de nuestro país se vio retrasada o impedida principalmente por los elevados costos de equipos y reactivos de los ensayos comerciales, por la ausencia de desarrollos tecnológicos regionales, el retraso en aplicar regulaciones locales para el tamizaje molecular de donantes y el poco número de laboratorios centralizadores de muestras [134].

En Argentina, existen 530.000 donaciones por año derivadas principalmente de donantes de reposición y distribuidas en un gran número de BS públicos y privados (251 BS con 16 centros provinciales) [135]. Además, la prevalencia de las infecciones por HIV-1 en países con recursos limitados es casi siempre más alta que en los países desarrollados, por lo que en nuestro medio se pueden esperar más casos de detección del ARN viral durante el PVS entre los donantes de sangre [111].

Desde el año 2004, cuatro laboratorios del ámbito privado (CDCBios, Hospital Italiano de Rosario, Fundación Hemocentro Buenos Aires y Fundación Hemocentro Sarmiento) introdujeron sistemas NAT para la detección del ARN-HCV basados en el sistema *NucliSens® Basic kit* (bioMérieux, Holanda) utilizando *pooles* de 48 muestras [136, 137]. En el 2005, el Hospital Italiano de Rosario implementó un sistema NAT basado en RT-PCR “*in house*” en muestras individuales, validado según las recomendaciones de la *International Conference on Harmonization*. En el 2006, tres laboratorios empezaron a utilizar los sistemas comerciales de *Roche Molecular Systems* para el tamizaje de HCV y HIV con extracción manual de ácidos nucleicos validado para *pooles* de 6 muestras. Actualmente, varios laboratorios emplean también el *Procleix Ultrio* para la detección de HCV, HBV y HIV-1 en muestras individuales y,

recientemente se sumó el Hospital Garrahan de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires (CABA) para analizar muestras de sangre de donaciones procedentes de una red de 22 hospitales porteños y del Hospital Posadas [138]. Según el documento consenso del 2012 de la Asociación Argentina de Hemoterapia e Inmunohematología (AAHI), en nuestro país se comunicó la detección de 13 donantes en PVS por sistemas NAT en un total de 657.818 muestras analizadas (Tabla 3), de los cuales 6 estaban infectados con el HIV-1 [128].

A pesar de estas iniciativas, la mayoría proveniente del ámbito privado, al momento en Argentina no existen regulaciones oficiales para la implementación de los sistemas NAT en BS a nivel nacional. En el 2010, el Ministerio de Salud del Gobierno de Córdoba ha declarado la obligatoriedad en toda la provincia de realizar la detección de HBV, HCV y HIV por NAT en todas las unidades de sangre [139]. Sin embargo, la carencia de unificación de criterios en la aplicación de estas metodologías coloca en situación de desigualdad jurídica a los diferentes BS del país que no cuentan con estas iniciativas, con respecto al nivel de seguridad transfusional que ofrecen a los pacientes que asisten.

Tabla 3. Donaciones de sangre estudiadas por NAT en Argentina hasta 2012 [128].

Número de muestras estudiadas	Muestras NAT positivas				Procedencia
	HIV	HCV	HBV	Total	
218.905	3	1	4	8	CABA
148.500	1	0	1	2	Córdoba
12.039	1	0	0	1	CABA
58.881	1	0	0	1	CABA
78.398	0	0	NC	0	Rosario
42.595	NC	NC	0	0	Rosario
43.500	0	1	0	1	CABA
55.000	0	0	0	0	Rosario
657.818	6	2	5	13	

NC: no corresponde

1.10.2 REQUERIMIENTOS PARA LA INTRODUCCIÓN DE NAT EN MEDICINA TRANSFUSIONAL.

Los sistemas NAT requieren de diversas etapas dependiendo de la tecnología empleada:

- **Sistemas basados en TMA** (*Procleix® HIV-1/HCV*, *Procleix® Ultrio* y *Procleix® Ultrio Plus*): constan de 3 etapas principales que se llevan a cabo en un mismo tubo de reacción: *i*) preparación de la muestra donde los ácidos nucleicos virales son extraídos, *ii*) amplificación de un segmento genómico del virus utilizando dos enzimas, la RT del virus de la leucemia murina de Moloney (MMLV, del inglés *Moloney Murine Leukemia Virus*) y la T7 ARN polimerasa, y *iii*) la detección de los productos de ARN amplificados mediante ensayo de protección de hibridación (HPA, del inglés *Hybridization Protection Assay*) y quimioluminiscencia [140-142].

- **Sistemas basados en RT-PCR** (COBAS® *AmpliScreen* HIV-1 Test v 1.5): constan de 5 etapas principales:
 - i) preparación de la muestra donde los ácidos nucleicos virales son concentrados por centrifugación a alta velocidad y extraídos, ii) retrotranscripción del ARN viral para generar el ADNc, iii) amplificación de un segmento genómico del virus utilizando una ADN polimerasa termoestable, iv) hibridación de los productos de ADN a sondas específicas, y v) detección colorimétrica de los híbridos producto-sonda [143].
- **Sistemas basados en RT-qPCR** (COBAS® *TaqScreen* MPX Test): constan de 2 etapas: i) preparación de la muestra donde los ácidos nucleicos virales son extraídos, ii) retrotranscripción y amplificación de un segmento genómico del virus en el mismo tubo con detección en simultánea utilizando sondas de hidrólisis tipo *Taqman*® [144].

Independientemente de la metodología utilizada todos los sistemas NAT deben poseer controles adecuados con el fin de asegurar la calidad del resultado: i) **control de reactivos** (CR) para evaluar la presencia de contaminaciones de ADN foráneo o productos de amplificaciones precedentes, ii) **control negativo** (CN) para comprobar la especificidad de la reacción, iii) **control positivo** (CP) para indicar que la reacción funcionó satisfactoriamente, y iv) **control interno** (CI) para verificar la idoneidad de la muestra a la amplificación y/o la presencia de inhibidores en la misma.

La producción de un CI para las técnicas cuyo virus *target* posea un genoma de ARN (tales como el HCV y el HIV-1) ha sido dificultosa debido a la labilidad intrínseca de esta molécula. Se han planteado diversas estrategias para el desarrollo de CI estables de ARN:

- **CI clase 1:** la producción por transcripción *in vitro* a partir de la secuencia de interés clonada en un vector de expresión bajo el control de un promotor inducible [145].
- **CI clase 2:** la utilización de derivados del agente infeccioso en sí.
- **CI clase 3:** la utilización de pseudo-fagos que contengan secuencias del agente infeccioso y que estén empaquetadas en cápsides fágicas [146, 147].

Los CI de ARN desnudos (clase 1) son útiles para controlar la eficiencia de la reacción de RT-PCR pero no indican la calidad del procesamiento de la muestra y son susceptibles a la degradación por ARNasas. Por otro lado, los CI clase 2 presentan como desventaja adicional la exposición de los laboratoristas a un agente potencialmente infeccioso. Respecto a los CI clase 3, cumplen todos los requerimientos para ensayos moleculares pero aquellos disponibles comercialmente, como por ejemplo el basado en la tecnología *Armored RNA* [146], están sujetos a protección por patentamiento lo que los hace muy costosos para su implementación de rutina.

Un CI apropiado para ensayos moleculares con fines diagnósticos debe ser homogéneo, estable, seguro para el personal de laboratorio que lo manipula y capaz de verificar tanto la eficiencia en el procesamiento de la muestra como en la reacción de amplificación. El **CI competitivo** (CIC) cumple con los requisitos mencionados, ya que la secuencia diana y el CI se amplifican con el mismo par de cebadores,

en el mismo tubo de reacción y en las mismas condiciones. Por lo tanto, de las diversas estrategias planteadas para el desarrollo de CIC estables de ARN, la utilización de pseudo-fagos que contengan secuencias del agente infeccioso para ser empaquetadas en bacteriófagos (CI clase 3) son los que cumplen todos los requerimientos para ensayos moleculares [146].

1.10.3 BACTERIÓFAGO Q β COMO HERRAMIENTA EN BIOTECNOLOGÍA.

El bacteriófago Q β pertenece al género *Allolevivirus* (grupo B) [148] dentro de la familia *Leviviridae* que incluye a los virus con genoma de ARN más pequeños conocidos. Infechan a cepas de *Escherichia coli* (*E.coli*) F⁺, a las que ingresan uniéndose al pili [13, 149]. Su genoma es de ARN simple hebra con sentido positivo de 4.219 nucleótidos que codifica para una replicasa y 3 proteínas estructurales: i) la proteína de maduración (pMa) de 421 AA, ii) la proteína mayor de la cubierta (pC) de 133 AA y iii) la proteína A1 de 329 AA [150] (Figura 12). Su cápside es de geometría icosaédrica y consiste mayoritariamente de la proteína de la cubierta, algunas moléculas de la proteína A1 y una copia de la pMa que media la interacción con el pili del hospedador. Debido a que la mayor parte del genoma del fago es codificante (90%), las secuencias que actúan en *cis* se superponen con los dominios codificantes [151]. De esta manera en el genoma está almacenada la información para la síntesis de las proteínas necesarias para la replicación, encapsidación, infección y lisis celular, pero además la secuencia *per se* asegura el correcto plegamiento del ARN genómico.



Figura 12: Regiones codificantes y no codificantes en el genoma de Q β .

Se marcan abajo las zonas involucradas en la formación de estructuras secundarias que cumplen funciones regulatorias.

pMa: proteína de maduración. pC: proteína mayor de la cubierta. pA1: proteína A1.

Se ha utilizado este bacteriófago, así como a otros miembros de la familia *Leviviridae*, como instrumentos para la expresión de epitopes en la proteína C [152]. En Q β se ha visto que las inserciones en la región C-terminal de la proteína A1 no alteran la formación y ensamblado de partículas fágicas, obteniéndose de esta manera cápsides recombinantes expresando, por ejemplo, epitopes preS1 del HBV [148] y de la enzima dihidrofolato reductasa [153]. La comparación por microscopía electrónica de las cápsides de los viriones de Q β y de las recombinantes, reveló una alta similitud en su naturaleza icosaédrica [148].

Otra aplicación del fago Q β como herramienta biotecnológica proviene de nuestro laboratorio. Hemos construido un derivativo de Q β para ser utilizado como CIC para su uso en la detección cualitativa del ARN del HCV a través del ensayo RT-PCR-HCV/CIC_{HCV} [154]. El CIC_{HCV} consiste en un fago Q β recombinante en el cual se han reemplazado secuencias fágicas por las del par de cebadores usados para la detección

del ARN-HCV. Según nuestra estrategia, el CIC_{HCV} es añadido a la muestra de plasma, procesado conjuntamente con el ARN viral y amplificado por RT-PCR utilizando el mismo par de cebadores que para HCV. Posteriormente, los amplicones resultantes son discriminados mediante hibridación líquida con sondas específicas para cada *target* y detección colorimétrica en formato EIA. El CIC_{HCV} demostró ser estable por al menos 452 días a 4°C y por 125 días luego de su reconstitución a partir del liofilizado [154].

El sistema RT-PCR-HCV/CIC_{HCV} puede detectar 500 UI/ml de ARN-HCV, todos los genotipos presentes en Argentina y es usado para el diagnóstico de la infección de HCV en pacientes atendidos en distintos Servicios Públicos de Salud. En lo que respecta a su aplicación como ensayo NAT, presenta una sensibilidad analítica de 79 UI/reacción (527 UI/ml) [IC_{95%}: 59,0 – 136,6 UI/reacción] determinada por *análisis de progresión probit* con 20 réplicas, cuando se parte de 150 µl de plasma. Bajo estas condiciones, se obtuvo un límite de detección de 5 UI/reacción (33 UI/ml). La sensibilidad clínica se evaluó en 193 muestras de plasma (101 muestras del 2010 y 93 muestras del 2011) en doble ciego procedentes del Servicio de Hemoterapia del Hospital Provincial del Centenario de la ciudad de Rosario que fueron oportunamente rechazadas para transfusión por poseer algún marcador serológico positivo o por autoexclusión.

Los resultados obtenidos (Tabla 4) muestran que de las 193 muestras analizadas con el ensayo RT-PCR-HCV/CIC_{HCV}, 8 (4%) arrojaron resultados inválidos en el test RT-PCR-HCV/CIC_{HCV} por presentar valores negativos en la detección del CIC_{HCV} y, por lo tanto, fueron excluidas para el análisis de la sensibilidad clínica. Esta situación pone de manifiesto la importancia de incluir controles de calidad de todo el proceso, como el CIC_{HCV}, ya que permiten discriminar los resultados negativos de los resultados falsamente negativos como fue el caso de estas 8 muestras.

Tabla 4. Análisis de la sensibilidad clínica del ensayo RT-PCR/HCV/CIC_{HCV}.

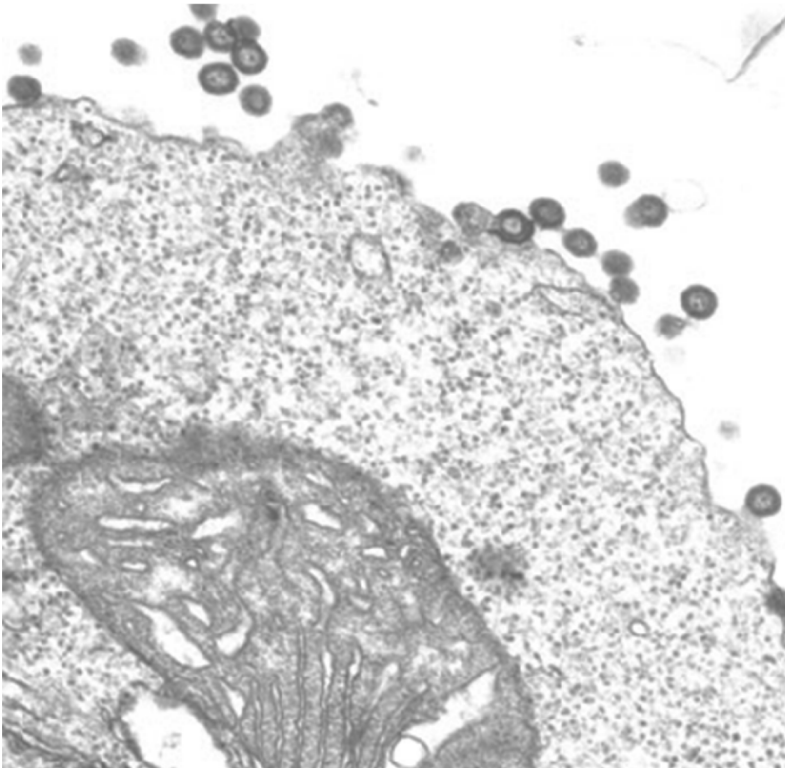
		NAT			Total
		Detectable	No detectable	Inválido	
Serología	Reactivo	3	1	0	4
	No reactivo	15	166	8	189
Total		18	167	8	193

La concordancia general entre la serología para HCV y el sistema NAT en las 185 muestras con resultados válidos fue del 91,3% (169/185). De los 18 (9,7%) individuos que arrojaron valores detectables por biología molecular según el VC, sólo 3 presentaban serología reactiva para HCV. Los individuos que presentaron resultados de anticuerpos anti-HCV No reactivos/NAT Detectable han sido citados por la Directora del Servicio de Hemoterapia para una nueva toma de muestra que permita confirmar o descartar la eventual infección en PVS por HCV. De los 167 (90,3%) individuos que arrojaron valores no detectables por biología molecular según el VC, 1 presentó serología reactiva para HCV. En efecto, la

presencia de viremia intermitente en los pacientes infectados con el HCV es frecuente y refuerza la necesidad de realizar el dosaje conjunto de anticuerpos anti-HCV y ARN viral en el tamizaje de donantes.

En conclusión, hemos podido construir un CIC específico para la detección molecular de HCV basado en el bacteriófago Q β que cumple con todas las exigencias para su uso en sistemas de detección viral con fines diagnósticos y que constituye un requisito esencial en los ensayos NAT desarrollados *in house* aplicables al tamizaje de donantes. Disponer de la capacidad de generar este reactivo permite plantear el desarrollo de sistemas NAT para otros virus transmitidos por transfusión en PVS como el HIV-1, con costos razonables y con tecnología y recursos humanos nacionales. Esta herramienta adquiriría relevancia para aumentar efectivamente la seguridad transfusional en nuestro país, y pondría a disposición una tecnología diseñada en base a las cepas que circulan en nuestra región, aspecto crítico en lo referente a la infección por HIV-1 y la situación epidemiológica planteada.

2. OBJETIVOS



2.1 OBJETIVO GENERAL.

El HIV/SIDA sigue siendo un grave problema sanitario a nivel mundial, con aproximadamente 35 millones de personas infectadas globalmente según el informe de ONUSIDA correspondiente al año 2013 [33]. En la Argentina 110.000 personas conviven con el HIV-1, y se estima que aproximadamente el 30% de ellas desconoce su estado de infección. Anualmente se diagnostican alrededor de 5.000 nuevas infecciones, fallecen 1.400 personas por SIDA y se infectan alrededor de 100 niños por transmisión vertical [127]. Los datos disponibles permiten confirmar ciertas tendencias que se vienen observando desde hace algunos años, como el ligero descenso en la cantidad de diagnósticos en mujeres y el crecimiento de los diagnósticos en varones, lo que en conjunto lleva al aumento de la razón hombre/mujer a niveles semejantes a los registrados a principios de la década pasada. Además se han incrementado los diagnósticos en varones infectados por relaciones sexuales desprotegidas con otros varones y la persistencia en las tasas de diagnósticos tardíos, que alcanzan el 15% de las mujeres y el 27% de los varones [127]. De esto se desprende que es necesario fortalecer los servicios de salud pública para no perder las oportunidades de detectar precozmente la infección. En este escenario, incorporar metodologías que contribuyan a disminuir el riesgo de transmisión del HIV-1 por transfusión permitiría aumentar la seguridad transfusional para el receptor y proveer un diagnóstico oportuno para el donante y disminuir la morbi-mortalidad causada por el virus.

Si bien en las últimas décadas la detección de anticuerpos específicos y antígenos virales ha contribuido a disminuir marcadamente las infecciones virales transmitidas por transfusión, los marcadores serológicos pueden arrojar resultados no reactivos cuando el donante infectado está atravesando el PVS, que para el HIV-1 es de 15 días. En ese sentido, el desarrollo e implementación de ensayos NAT para el tamizaje de los donantes de sangre ha permitido reducir el tiempo de detección de la infección por HIV de 5 a 6 días, con la correspondiente disminución del riesgo residual de infección por vía transfusional. No obstante, la aplicación de ensayos NAT en el ámbito público del país y en particular en la provincia de Santa Fe, sigue siendo un tema pendiente. La falta de ensayos con un costo sostenible, que incluyan los controles de calidad necesarios para asegurar la calidad de los resultados y que hayan sido validados según las pautas establecidas por los organismos de referencia es sin duda una de las causas de esta demora. Asimismo, y en virtud de la elevada diversidad genética del HIV-1 a escala mundial, es necesario conocer las cepas que circulan en cada región geográfica a fin de hacer más eficiente la vigilancia genómica de la infección. En efecto, la introducción de variantes no-B y la circulación estable de formas recombinantes como las CRF12_BF y URF_BF en Argentina, requieren de nuevas estrategias de tamizaje que permitan conocer de manera más dinámica las características particulares de la epidemia en nuestra región.

En base a estas consideraciones, este trabajo de tesis tiene por objetivo general mejorar la capacidad del diagnóstico precoz de la infección por el HIV-1 y aumentar la seguridad transfusional en el ámbito

público. Con ese objetivo, hemos desarrollado un ensayo para la detección sensible y específica de las cepas del HIV-1 circulantes en Argentina que podría ser adaptado como herramienta NAT para identificar a aquéllos individuos que se encuentren en PVS. El ensayo de detección de HIV-1 desarrollado incluye los controles adecuados para verificar todas las etapas analíticas del proceso, detecta todos los subtipos del grupo M del HIV-1, requiere equipamiento mínimo y puede adaptarse a laboratorios de baja complejidad. Además presentamos una nueva estrategia para identificar subtipos y cepas recombinantes a través de la T_m obtenida mediante qPCR y curvas de disociación validada por filogenia que puede ser de utilidad para monitorear la evolución de la infección por HIV-1 en nuestra región. Disponer de estos instrumentos permitirá evaluar la aplicación del tamizaje molecular de donantes en el ámbito público de la provincia de Santa Fe y conocer de manera fehaciente las cepas circulantes en la región para posicionarse de manera más efectiva en el control epidemiológico de las infecciones causadas por el HIV-1.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

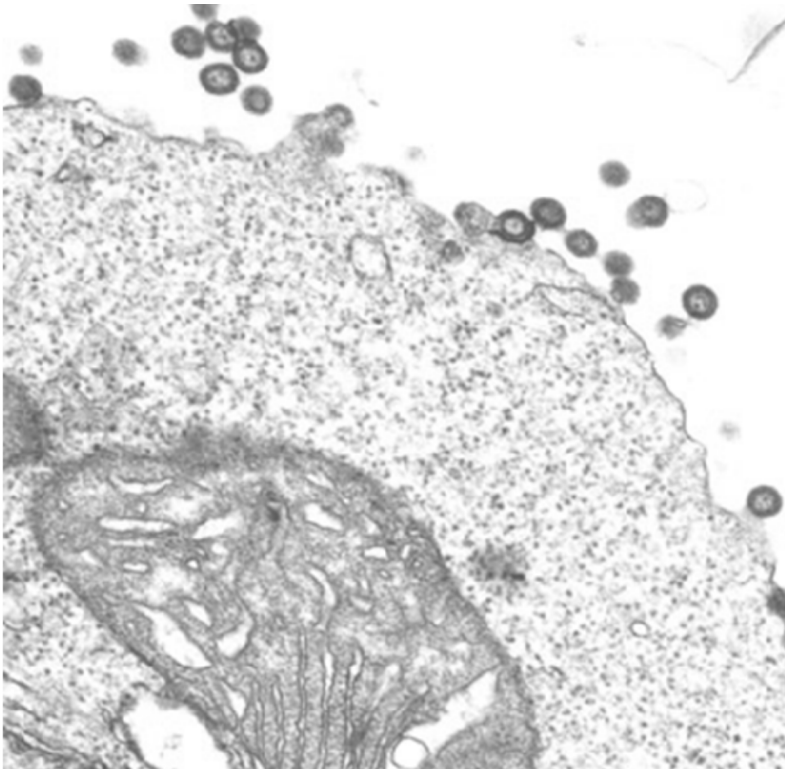
I. Desarrollo de un ensayo para el tamizaje molecular de HIV-1.

- i) Análisis genómico de los subtipos e inter-subtipos del HIV-1 descriptos en la bibliografía para el diseño de cebadores que permitan la detección de las cepas circulantes en Argentina y Sudamérica.
- ii) Desarrollo de un ensayo para la detección y tipificación molecular del ARN de los distintos subtipos e inter-subtipos del HIV-1.
- iii) Desarrollo de CICs: Construcción de fagos recombinantes derivado del bacteriófago Q β con secuencias heterólogas.
- iv) Implementación de los fagos recombinantes como CIC para la detección del ARN de HIV-1 (CIC_{HIV}).

II. Caracterización molecular de variantes del HIV-1.

- i) Diseño de una estrategia para tipificar las cepas del HIV-1 a través de la temperatura de fusión obtenida por el análisis de las curvas de disociación derivadas de la amplificación de diversas regiones genómicas del virus por PCR en tiempo real.
- ii) Diseño de una prueba de referencia para determinar los subtipos reales para evaluar la factibilidad de tipificar los subtipos B y F del HIV-1 en base a la temperatura de fusión (T_m).
- iii) Desarrollo experimental de la estrategia de tipificación en base a las T_m empíricas derivadas de cada región génica analizada en base al subtipo real definido en la prueba de referencia y validación de los resultados obtenidos.

3. MATERIALES y MÉTODOS



3.1 CEPAS BACTERIANAS, PLÁSMIDOS Y BACTERIOFAGOS.

El genotipo de las distintas cepas bacterianas y las características de los plásmidos y bacteriófagos utilizados se detallan en la Tabla 5.

Tabla 5. Cepas bacterianas, plásmidos y bacteriófagos.

Cepa	Descripción	Referencia u origen
<i>E. coli</i> DH5 α	<i>supE44, ΔlacU169, (ϕ80lacZ ΔAM15), hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, thi1, relA1.</i>	Colección laboratorio.
<i>XL1 Blue</i>	<i>MRF' (\wedge(mcrA) 183 \wedge(mcrB- hsd SMR- mrr) 173 endA1 supE44 ti-1 recA1 gyrA96 lac [F' proAB lacI^q Z \wedgeM15 Tn10 (Tet^r) Amy Cam^r]))</i>	Colección laboratorio.
<i>BL21</i>	<i>(F⁻ dcm ompT hsdS(rB⁻ mB⁻) gal [lon] (DE3 immP21int⁻ lacI⁺lacUV5::lacZ::T7 RNA polimerasa)</i>	Colección laboratorio.
<i>BL21/pLys S</i>	<i>(F⁻ dcm ompT hsdS(rB⁻ mB⁻) gal [lon] (DE3 immP21 int⁻ lacI⁺lacUV5::lacZ::T7 RNA polimerasa) [pLys S cam^r])</i>	Colección laboratorio.

Bacteriófago	Descripción	Referencia u origen
<i>Qβ_{WT}</i>	<i>Fago con genoma a ARN simple hebra (+) que infecta E. coli F⁺ (N° GenBank: FJ483841.1).</i>	Colección laboratorio [155]
<i>Qβ_{HCV}</i>	<i>Derivado de Qβ_{WT} en el cual se reemplazaron las secuencias 2170-2189 nt y 2329-2348 nt en el genoma del fago por 2 secuencias de 20 nucleótidos correspondientes a los cebadores KY78 y KY80 [156] que amplifican la región 5'NTR del HCV.</i>	Colección laboratorio [154]
<i>Qβ_{SUD}</i>	<i>Derivado de Qβ_{WT} en el cual se han reemplazaron las secuencias 2170-2189 nt y 2329-2348 nt en el genoma del fago por 2 secuencias de 20 nucleótidos correspondientes a los cebadores SUD que amplifican un fragmento de la región gag de HIV-1.</i>	Este trabajo
<i>Qβ_{SK}</i>	<i>Derivado de Qβ_{WT} en el cual se reemplazaron las secuencias 2170-2199 nt y 2321-2348 nt en el genoma del fago por 2 secuencias de 20 nucleótidos correspondientes a los cebadores SK [157] que amplifican un fragmento de la región gag de HIV-1.</i>	Este trabajo

Plásmidos	Descripción	Referencia u origen
<i>pBRT7Qβ_{WT}</i>	<i>Plásmido derivado de pBR322 que posee clonado como ADNc el genoma de Qβ_{WT} bajo el control del promotor T7</i>	[158]
<i>pBRT7Qβ_{HCV}</i>	<i>pBRT7Qβ en el cual se reemplazaron las secuencias 2170-2189 nt y 2329-2348 nt del genoma del fago Qβ_{WT} por 2 secuencias de 20 pb de la región 5'NCR de HCV.</i>	[154]
<i>pBRT7Qβ_{SUD}</i>	<i>pBRT7Qβ en el cual se reemplazaron las secuencias 2170-2189 nt y 2329-2348 nt del genoma del fago Qβ_{WT} por 2 secuencias de 20 pb de la región gag del HIV-1.</i>	Este trabajo
<i>pBRT7Qβ_{SK}</i>	<i>pBRT7Qβ en el cual se reemplazaron las secuencias 2170-2189 nt y 2329-2348 nt del genoma del fago Qβ_{WT} por 2 secuencias, de 30 y 28 pb, de la región gag del HIV-1.</i>	Este trabajo
<i>pGEM[®]-T-Easy</i>	<i>Ori (colE1) Amp^r</i>	Promega (Maryland,EE.UU)

Tabla 5. Cepas bacterianas, plásmidos y bacteriófagos (continuación).

Plásmidos	Descripción	Referencia u origen
<i>pQβ_{SUD}</i>	<i>pGEM[®]-T-Easy</i> conteniendo un fragmento de 203 pb que incluye una región de la proteína A1 de Q β _{WT} limitada por 2 secuencias de 20 pb correspondientes a los cebadores SUD que amplifican un fragmento de la región gag del HIV-1.	Este trabajo
<i>pQβ_{SK}</i>	<i>pGEM[®]-T-Easy</i> conteniendo un fragmento de 203 pb que incluye una región de la proteína A1 de Q β _{WT} limitada por 2 secuencias de 30 y 28 pb correspondientes a los cebadores SK que amplifican un fragmento de la región gag del HIV-1.	Este trabajo
<i>p93BR020.1</i>	Genoma completo de un subtipo F de HIV-1 aislado en Brasil clonado en pCR2.1 (N° GenBank: AF005494)	[159]
<i>pNL4-3</i>	Genoma completo de un subtipo B de HIV-1 aislado en Francia clonado en pUC18 (N° GenBank: AF324493.2)	[160]

3.2 CONDICIONES Y MEDIOS DE CULTIVO.

3.2.1 MEDIOS DE CULTIVO PARA CÉLULAS BACTERIANAS.

El medio utilizado para el cultivo y mantenimiento de las cepas bacterianas fue Luria Bertani (LB) [161], cuya composición es: Peptona de caseína 10 g/l; Extracto de levadura 5 g/l; NaCl 5 g/l. Cuando este medio se requirió al estado sólido o semisólido se le agregó agar-agar a una concentración de 1,5 ó 0,75%, respectivamente.

Los antibióticos para selección se usaron en las siguientes concentraciones finales: *i*) Ampicilina (Amp) 100 µg/ml, *ii*) Tetraciclina (Tc) 10 µg/ml, y *iii*) Cloranfenicol (Cf) 20 µg/ml.

3.2.2 CRECIMIENTO BACTERIANO.

Los cultivos de *E. coli* se crecieron en medio LB a 37°C con agitación (250 rpm), en presencia del antibiótico correspondiente en caso de ser requerido. Los medios sólidos se cultivaron en estufa a 37°C.

3.2.3 LISADOS BACTERIANOS.

Se recogió con un palillo la colonia bacteriana a analizar y se resuspendió en 30 µl de H₂O destilada estéril. La lisis celular se realizó incubando 10 min en baño seco a 98°C. Los lisados se dejaron enfriar a temperatura ambiente para su uso.

3.3 MUESTRAS CLÍNICAS DE PLASMA Y CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA.

3.3.1 CONSIDERACIONES GENERALES.

Los procedimientos empleados en la obtención y uso de las muestras clínicas que se utilizaron en este trabajo de tesis, se realizaron teniendo en cuenta los criterios necesarios para cumplimentar con la Ley Nacional N° 25.326 de “Protección de los Datos Personales”. En base a estas consideraciones se puede afirmar que: *i*) el estudio realizado utilizó muestras residuales, *ii*) las muestras no fueron identificables individualmente, *iii*) las muestras no venían acompañadas de información clínica, *iv*) las muestras no

fueron utilizadas para finalidades incompatibles con aquellas que motivaron su obtención, y v) las personas a cargo de pacientes cuyas muestras fueron estudiadas no participaron de la investigación ni compartieron información con quienes condujeron la misma. Por lo tanto, la identidad del sujeto no fue conocida y no pudo de ninguna manera ser verificada por las personas involucradas en este trabajo de investigación.

En base a estas consideraciones, en este trabajo se utilizaron 2 tipos de muestras clínicas: i) lisados de PBMC para evaluar ADN proviral del HIV-1, y ii) plasma para analizar el ARN genómico.

Los lisados de PBMC (10^6 células/ml) fueron utilizados previamente en el trabajo de tesis de la Dra Roxana Gariglio, mientras que las muestras de plasma fueron cedidas por el Centro de Tecnología en Salud Pública (Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, UNR) luego de ser cuantificadas mediante el ensayo comercial VERSANT® 440 Molecular System desarrollado por *Siemens Healthcare Global*.

3.3.2 COMITÉ DE BIOÉTICA.

Todos los estudios y procedimientos realizados en este trabajo de tesis se ajustan a la Declaración de Helsinki y fueron aprobados por el Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas de la Universidad Nacional de Rosario (Expte. Nº 7380/002 del 15/05/2009; Anexo 2).

3.4 TÉCNICAS DE MANIPULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS.

3.4.1 ELECTROFORESIS DE ADN EN GELES DE AGAROSA.

La técnica se llevó a cabo según las indicaciones de Sambrook [161]. Se emplearon concentraciones de agarosa variables, entre 1% y 2%, según el tamaño de las moléculas de ADN que se deseaba separar. Los geles se prepararon en solución *buffer* TAE (Tris-acetato 40 mM; EDTA 10 mM, pH 8,0). Las corridas electroforéticas se realizaron en el mismo *buffer* a una intensidad de corriente de 80-90 mA.

Previo a la siembra, las muestras se mezclaron en una proporción 4:1 con una solución que contenía 0,25% de azul de bromofenol, 0,25% de xilenecianol, 30% de glicerol y agua estéril. Como marcador de peso molecular se empleó la escalera (*ladder*) ADN de 100 pb o 1 Kb (Embiotec, Argentina). Una vez finalizada la corrida electroforética, los geles fueron teñidos con solución de Bromuro de Etidio (0,5 µg/ml) y observados en transiluminador de luz UV (300 nm). Los geles fueron digitalizados utilizando una cámara digital Kodak, modelo EKB 9040.

3.4.2 PURIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS (PRODUCTOS DE PCR, ADN PLASMÍDICO, ARN VIRAL, ARN FÁGICO).

La purificación de productos de PCR se realizó con el equipo comercial NucleoSpin Extract II (Macherey-Nagel, Alemania) según las instrucciones del proveedor.

Para aislar los fragmentos de ADN para su posterior clonado, los productos de PCR o las muestras de ADN digeridas con enzimas de restricción se separaron por electroforesis en geles de agarosa en las

condiciones señaladas anteriormente (Ítem 3.4.1). La zona del gel conteniendo el fragmento de ADN de interés se extrajo por corte con bisturí estéril y el ADN se purificó según el procedimiento planteado en el equipo comercial NucleoSpin Extract II (Macherey-Nagel, Alemania).

Para la preparación de ADN plasmídico se utilizó el equipo comercial NucleoSpin Plasmid (Macherey-Nagel, Alemania) siguiendo las instrucciones del proveedor. El ADN plasmídico se resuspendió en H₂O destilada estéril y se conservó a -20°C hasta su uso.

La extracción de ARN viral o de las partículas fágicas a partir de muestras de plasma o de soluciones de lisado, respectivamente, se realizó utilizando el equipo comercial RNA Virus NucleSpin (Macherey-Nagel, Alemania) según las indicaciones del proveedor.

3.4.3 ESTIMACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE ADN.

La cuantificación del ADN obtenido a partir de las preparaciones de ADN plasmídico se realizó por medidas espectrofotométricas a 260 nm y se calculó la concentración según el valor leído, teniendo en cuenta que 1 unidad de absorbancia a 260 nm corresponde a 50 µg/ml de ADN doble hebra. Para esto se utilizó una dilución adecuada del plásmido.

La estimación de la concentración de ADN de los fragmentos purificados a partir de geles de agarosa para ser usados en reacciones de ligación, se realizó por comparación con ADN de fago λ de concentración conocida (0,025 µg/µl). Se sembraron cantidades crecientes de dicho ADN en el mismo gel de agarosa (1%) donde se sembraron los fragmentos de interés (20% del volumen total).

3.4.4 DIGESTIÓN DE ADN CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN.

Las condiciones de corte usadas fueron las recomendadas por los proveedores de las distintas endonucleasas de restricción. En términos generales, se utilizó aproximadamente 1 U de enzima por µg de ADN. Los resultados de los cortes con enzimas de restricción se verificaron mediante electroforesis de los productos obtenidos en geles de agarosa, estimando el tamaño de los fragmentos generados por comparación con marcadores de peso molecular adecuados.

3.4.5 LIGACIÓN DE MOLÉCULAS DE ADN.

Las reacciones de ligación en las que se utilizó el vector pGEM®-T-Easy (Promega, EE.UU.) se llevaron a cabo en tampón 2X para la ADN ligasa y 1 U de la enzima ADN ligasa del bacteriófago T4 (Fermentas, Canadá). Se utilizó una relación molar de ADN inserto:vector de 10:1, en un volumen final de 10 µl. La mezcla de ligación se incubó a temperatura ambiente durante 16 hs.

Las reacciones de ligación en las que se utilizó el vector pBRT7Qβ_{WT} cortado, se realizaron en un volumen final de 20 µl usando 1 U de ADN ligasa del bacteriófago T4 (Fermentas, Canadá), 2 µl de la solución tampón específica para la enzima y las cantidades necesarias de inserto y de vector para cada caso. La reacción se incubó durante 16 hs a temperatura ambiente.

3.4.6 TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS *E. coli* POR ELECTROPORACIÓN.

Inducción del estado de competencia: las células *E. coli* DH5 α a transformar fueron crecidas en medio LB con agitación permanente a 37°C hasta fase estacionaria. Se inocularon 500 ml de medio LB fresco con 5 ml del cultivo saturado y se creció a la misma temperatura hasta DO₆₃₀ = 0,6. Dicho cultivo se enfrió en hielo durante 20 min y se centrifugó a 4°C durante 10 min a 6.500 rpm en la centrífuga Avanti J-25 (Beckman Coulter, EE.UU.). El sedimento celular obtenido se lavó 3 veces con 1 volumen de H₂O destilada estéril fría y 1 vez con 10 ml de glicerol 10% (v/v). Finalmente, el sedimento celular se resuspendió en 1 ml de glicerol 10% (v/v) y se realizaron alícuotas en tubos estériles que fueron guardados a -70°C hasta el momento de su uso.

Transformación de células competentes con ADN plasmídico: trabajando en hielo, se colocaron alícuotas de 40 μ l de las células competentes obtenidas en una celda de electroporación. Se agregaron 1-5 μ l del plásmido y se electroporaron utilizando un voltaje de 2.3 kV (BioRAD *E. coli* pulser, EE.UU.). Luego se agregó 1 ml de medio LB sin antibiótico y se incubó 1 h a 37°C con agitación constante. Por último, las células se centrifugaron 5 min a 6.000 rpm y se sembraron 100 μ l con espátula de Drigalsky en placas de Petri conteniendo LB-agar suplementado con Amp en concentración adecuada para seleccionar las bacterias transformadas. Las células se incubaron a 37°C durante una noche.

3.4.7 TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS *E. coli* POR SHOCK TÉRMICO.

Inducción del estado de competencia: se realizó de acuerdo al método descrito por Kushner [162]. Las células *E. coli* BL21pLysS o DH5 α a transformar fueron crecidas hasta fase estacionaria en medio LB, se diluyeron 1/50 en el mismo medio y se cultivaron hasta llegar a una concentración celular de 2×10^8 cel/ml. Se trabajó manteniendo siempre las células en hielo. Se cosecharon por centrifugación durante 2 min a 7.000 rpm en microcentrífuga Eppendorf, se resuspendieron en mitad del volumen original en solución I (MOPS pH=7,0 10 mM, KCl 10 mM). Se cosecharon nuevamente en idénticas condiciones y se resuspendieron en mitad del volumen original en solución II (MOPS pH=6,5 100 mM, KCl 10 mM, CaCl₂ 50 mM) se incubaron 15 min en hielo y se centrifugaron nuevamente. El precipitado celular se resuspendió en 1/10 del volumen original en solución II y se mantuvieron en hielo hasta su transformación.

Transformación de células competentes con ADN plasmídico: alícuotas de 100 μ l de estas células competentes se transformaron agregando cantidades adecuadas de los diferentes plásmidos. Las mezclas de transformación se mantuvieron en hielo durante 1 h, luego se sometieron a tratamiento térmico a 42°C por 1 – 2 min, se les agregó 1 ml de LB fresco y se incubaron durante 1 h a 37°C. Este último paso permite la expresión de los marcadores fenotípicos adquiridos. Los clones transformantes se obtuvieron sembrando con espátula de Drigalsky en placas de Petri conteniendo LB-Agar suplementado con el antibiótico de selección correspondiente y se crecieron durante 16 hs a 37°C.

3.5 TÉCNICAS PARA EL TRABAJO CON BACTERIÓFAGOS.

3.5.1 OBTENCIÓN DE LISADOS FÁGICOS.

A partir de un cultivo en fase estacionaria de cada cepa *E.coli* BL21/pLysS conteniendo los plásmidos para la expresión de los genomas fágicos salvaje ($Q\beta_{WT}$) o recombinantes ($Q\beta_{SUD}$ o $Q\beta_{SK}$) se realizó una dilución 1/50 y se cultivaron hasta fase exponencial ($DO_{600} = 0,6$) a 37°C. Se indujo la expresión del genoma fágico correspondiente con el agregado de IPTG en una concentración final 1 mM y se continuó el crecimiento a 37°C. Luego de la inducción se tomaron alícuotas de dicho cultivo con intervalos de 1 h, se centrifugaron 2 min en microcentrífuga Eppendorf a 10.000 rpm, se agregó cloroformo al sobrenadante (1/10) y se centrifugaron nuevamente para eliminar restos celulares. Se recogieron alícuotas luego de las 4 hs luego de la inducción y a partir de cada lisado se realizaron diluciones secuenciales.

3.5.2 TITULACIÓN DE LOS LISADOS DE $Q\beta_{WT}$ Y RECOMBINANTES.

Para la infección se creció la cepa XL1 Blue F', sensible a $Q\beta$, en LB suplementado con Tc hasta fase estacionaria; alícuotas de 100 μ l se infectaron con las distintas diluciones del lisado (10 μ l) en presencia de $CaCl_2$ 5 mM y $MgCl_2$ 10 mM, durante 30 min a 37°C. Luego del agregado de LB semisólido, las mezclas se esparcieron sobre placas de Petri conteniendo LB sólido. Se incubaron a 37°C durante 16 hs y se contabilizaron las placas de lisis obtenidas para las diferentes diluciones.

3.5.3 PURIFICACIÓN DE FAGOS POR EL MÉTODO MODIFICADO DE YAMAMOTO.

Se realizó de acuerdo al protocolo descrito por Yamamoto [163]. Para ello, se preparó un litro de cultivo a partir de una dilución 1/50 de un cultivo saturado de cada cepa *E.coli* BL21/pLys conteniendo los plásmidos correspondientes para la expresión de los genomas fágicos salvaje ($Q\beta_{WT}$) o recombinantes ($Q\beta_{SUD}$ o $Q\beta_{SK}$) en LB suplementado con Amp y Cf. Se creció a 37°C hasta fase exponencial ($DO_{600} = 0,6$) y se realizó la inducción por el agregado de IPTG a una concentración final 1 mM. Se mantuvo a 37°C con agitación durante 2 hs. Se centrifugó a 16.000 g por 5 min y se trabajó con cada sobrenadante conteniendo las partículas fágicas correspondientes. Se agregaron ADNasa I y ARNasa A, ambas a una concentración final de 1 μ g/ml, y se incubó 30 min a temperatura ambiente. Se agregó NaCl a una concentración final 1 M, se disolvió y se mantuvo en hielo por 1 h. Se centrifugó a 11.000 g por 10 min a 4°C. Se llevó el sobrenadante a un envase limpio. Se agregó PEG 8.000 a una concentración final 10% P/V. Se disolvió por agitación lenta en agitador con barra magnética a temperatura ambiente. Se enfrió en agua fría y se mantuvo en esta condición por 1 h para permitir que los fagos formasen un precipitado. Se centrifugó a 11.000 g por 10 min a 4°C para recuperar los fagos. Se descartó el sobrenadante. Se removieron los restos de sobrenadante con pipeta. Se resuspendió el sedimento en medio SM (NaCl 5,8 g/l, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 2 g/l, 50 ml Tris HCl pH: 7,5 1 M, 5 ml Gelatina 2%) lavando las paredes de los tubos ya que los fagos se adhieren a éstas. Se mantuvo a 4°C hasta el día siguiente. Se agregó un volumen de

cloroformo, se agitó por 30 s y se centrifugó 15 min a 1.600 g a 4°C para separar la fase orgánica de la acuosa. Se recuperó la fase acuosa conteniendo los fagos. Se mantuvo a 4°C. Se centrifugó a 30.000 rpm por 2 hs a 4°C en un rotor Beckman SW40 y se eliminó el sobrenadante sin remover el precipitado. Se agregó 1 ml de medio SM, se dejó durante una noche a 4°C y luego se resuspendió con pipeta. Cada suspensión se almacenó a 4°C.

3.5.4 ELIMINACIÓN DEL ADN PLASMÍDICO DE LOS LISADOS DE Qβ.

Se trabajó con 160 U ADNasa RQ (Promega, EE.UU.) en dos dosis consecutivas de 14 – 16 hs cada una. Luego del tratamiento correspondiente, la reacción se interrumpió con el agregado de solución de frenado comercial provista con la enzima.

3.5.5 ELIMINACIÓN DEL ARN LIBRE DE LOS LISADOS DE Qβ.

Se trabajó con una concentración de ARNasa A (Promega, EE.UU.) de 10 µg/ml durante un tiempo de reacción de 90 min a 37°C. Luego del tratamiento, la reacción se interrumpió con el agregado de solución de inhibición comercial provista con la enzima.

3.6 REACCIONES DE AMPLIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS.

Para todas las reacciones de amplificación se utilizaron termocicladores Mastercycler® modelos 5331 y 5332 (Eppendorf, Alemania), con excepción de las que se realizaron en un termociclador en tiempo real para tipificar subtipos de HIV-1 en base a Tm, las cuales se detallan en el ítem 3.8. Los cebadores utilizados se detallan en el Anexo 3. En las reacciones enzimáticas se utilizaron reactivos de los siguientes proveedores: i) Taq DNA Polimerasa recombinante 5 U/µl (Fermentas, EE.UU.), ii) cebadores (Sigma-Aldrich, EE.UU), iii) dNTPs Set 100mM de (Fermentas, EE.UU.), iv) RiboLock RNase Inhibitor 40U/µl (Fermentas, EE.UU.), y v) MMLV High Performance Reverse Transcriptase 200 U/µl (Epicentre, EE.UU.).

3.6.1 ENSAYOS PARA VERIFICAR LA PRESENCIA DE PLÁSMIDOS EN BACTERIAS TRANSFORMADAS.

Ensayo Cebadores	Condiciones de reacción	Perfil térmico
PCR de Colonia CS: M13-Fw CAS: M13-Rv	<i>5 µl de lisado bacteriano como molde, solución tampón 1X (Tris-HCl 10 mM pH 8,8; KCl 50 mM) – 2,5 mM de MgCl₂ – 133 µM de dNTP – 0,267 µM de cada cebador – 1 U de Taq ADN polimerasa – H₂O csp 50 µl.</i>	<i>desnaturalización inicial (2 min a 95°C) seguida por 35 ciclos de amplificación (1 min a 94°C, 1 min a 55°C y 1 min a 72°C) y síntesis final (5 min a 72°C).</i>

3.6.2 ENSAYOS DE AMPLIFICACIÓN PARA LA CONSTRUCCIÓN DE LOS Q β _{SUD} Y Q β _{SK}.

Ensayo Cebadores	Condiciones de reacción	Perfil térmico
PCR/MegaSUD CS: A1-Bst98 _{SUD} CAS: A1-Nsi _{SUD}	10 μ l del vector pBRT7Q β como molde, solución tampón 1X (Tris-HCl 10 mM Δ pH: 8,5-10,0 / KCl 50 mM) – Δ [MgCl ₂]: 1,5-3,0 mM – 400 μ M de dNTP – 0,6 μ M de cada cebador – 2,5 U de ADN Taq Polimerasa y H ₂ O csp 50 μ l.	desnaturalización inicial (5 min a 95°C) seguida de 35 ciclos de amplificación (20" a 95°C, 20" a 55°C y 20" a 72°C y síntesis final de 10 min a 72°C.
PCR/MegaSK CS: A1-Bst98 _{SK} CAS: A1-Nsi _{SK}	10 μ l del vector pBRT7Q β como molde, solución tampón 1X (Tris-HCl 10 mM Δ pH: 8,5-10,0 / KCl 50 mM) – Δ [MgCl ₂]: 1,5-3,0 mM – 400 μ M de dNTP – 0,6 μ M de cada cebador – 2,5 U de ADN Taq Polimerasa y H ₂ O csp 50 μ l.	desnaturalización inicial (5 min a 95°C) seguida de 35 ciclos de amplificación (20" a 95°C, 20" a 55°C y 20" a 72°C y síntesis final de 10 min a 72°C.
PCR-Qβ_{A1} CS: Q β -S CAS: Q β -AS	10 μ l del vector pBRT7Q β como molde, solución tampón 1X (Tris-HCl 10 mM pH 8,8; KCl 50 mM) – 2,5 mM de MgCl ₂ – 400 μ M de dNTP – 0,6 μ M de cada cebador – 2,5 U de ADN Taq Polimerasa y H ₂ O csp 50 μ l.	desnaturalización inicial (5 min a 95°C) seguida de 35 ciclos de amplificación (20" a 95°C, 20" a 55°C y 20" a 72°C) y síntesis final de 5 min a 72°C.

3.6.3 ENSAYOS PARA DETECCIÓN TEMPRANA DEL HIV-1 CON DETECCIÓN COLORIMÉTRICA.

3.6.3.1 Amplificación del ADN proviral del HIV-1.

Ensayo Cebadores	Condiciones de reacción	Perfil térmico
PCR/ALL CS: ALL-Fw CAS: ALL-Rv	10 μ l de lisado de PBMC como molde, solución tampón 1X (Tris-HCl 10 mM pH 8,8; KCl 50 mM) – 2,0 mM de MgCl ₂ – 400 μ M de dNTP – 0,6 μ M de cada cebador – 2,5 U de ADN Taq Polimerasa – H ₂ O csp 50 μ l.	desnaturalización inicial (2 min a 95°C) seguida de 5 ciclos de amplificación (20" a 95°C, 20" a 48°C y 20" a 72°C), 40 ciclos de amplificación (20" a 95°C, 20" a 42°C y 20" a 72°C) y síntesis final de 5 min a 72°C.
PCR/SK CS: SK145 CAS: SKCC1B	10 μ l de lisado de PBMC como molde, solución tampón 1X (Tris-HCl 10 mM pH 8,8; KCl 50 mM) – 1,5 mM de MgCl ₂ – 400 μ M de dNTP – 0,15 μ M de cada cebador – 2,5 U de ADN Taq Polimerasa – H ₂ O csp 50 μ l.	desnaturalización inicial (5 min a 95°C) seguida de 45 ciclos de amplificación (10" a 95°C, 10" a 55°C y 10" a 72°C) y síntesis final de 5 min a 72°C.
PCR/SUD CS: SUD-F1 CAS: SUD-R1	10 μ l de lisado de PBMC como molde, solución tampón 1X (Tris-HCl 10 mM pH 8,8; KCl 50 mM) – 1,5 mM de MgCl ₂ – 400 μ M de dNTP – 0,6 μ M de cada cebador – 2,5 U de ADN Taq Polimerasa – H ₂ O csp 50 μ l.	desnaturalización inicial (5 min a 95°C) seguida de 5 ciclos de amplificación (15" a 95°C, 15" a 55°C y 15" a 72°C), 40 ciclos de amplificación (15" a 95°C, 15" a 50°C y 15" a 72°C) y síntesis final de 5 min a 72°C.

3.6.3.2 Amplificación del ARN del HIV-1.

Ensayo Cebadores	Condiciones de reacción	Perfil térmico
RT CAS: SUD-R1 o CAS: SKCC1B	25 μ l del eluato de ARN purificado como molde, solución tampón 1X (Tris-HCl 10 mM pH 8,8; KCl 50 mM) – 2,0 mM de MgCl ₂ – 600 μ M de dNTP – 0,6 μ M del CAS ^[#] – 20 U de RiboLock RNase Inhibitor – 40 U de RT-MMLV – H ₂ O csp 50 μ l.	Incubación a 37°C durante 50 min seguida de la inactivación de la enzima RT-MMLV a 70°C durante 5 min.
Al tubo donde se llevó a cabo la retrotranscripción (ADNc) se adicionaron los reactivos para la amplificación. [#] el CAS utilizado dependen de la PCR realizada.		
PCR/SUD CS: SUD-F1	solución tampón 1X (Tris-HCl 10 mM pH 8,8; KCl 50 mM) – 2,0 mM de MgCl ₂ – 0,6 μ M del CS – 2,5 U de ADN Taq Polimerasa y H ₂ O csp 100 μ l.	desnaturalización inicial (5 min a 95°C) seguida de 5 ciclos de amplificación (15" a 95°C, 15" a 55°C y 15" a 72°C), 40 ciclos de amplificación (15" a 95°C, 15" a 50°C y 15" a 72°C) y síntesis final de 5 min a 72°C
PCR/SK CS: SK145	solución tampón 1X (Tris-HCl 10 mM pH 8,8; KCl 50 mM) – 2,0 mM de MgCl ₂ – 0,6 μ M del CS – 2,5 U de ADN-Taq Polimerasa y H ₂ O csp 100 μ l.	desnaturalización inicial (5 min a 95°C) seguida de 45 ciclos de amplificación (10" a 95°C, 10" a 55°C y 10" a 72°C) y síntesis final de 5 min a 72°C.

3.6.3.3 Revelado colorimétrico de las reacciones de amplificación.

Los productos amplificados biotinilados obtenidos en cada una de las reacciones de PCR o RT-PCR desarrolladas para determinar el estado de infección por HIV-1 (ensayos PCR/ALL, PCR/SUD, PCR/SK) fueron detectados mediante hibridación líquida con sondas no-radioactivas específicas para cada fragmento génico y un protocolo de revelado colorimétrico con formato de EIA. La estrategia de detección colorimétrica ha sido desarrollada previamente [164] y aplicada para la detección de distintos patógenos virales en nuestro laboratorio [165, 166]. El protocolo es similar para todos los ensayos y sólo se varían las concentraciones de sondas y las T_H (Tabla 6). Brevemente, se tomaron 2,5 μ l del producto amplificado biotinilado obtenido en cada ensayo y se adicionaron a 60 μ l de Solución de Hibridación (5 X SSC: NaCl 0,75 M, Citrato de sodio 0,075 M) conteniendo una cantidad adecuada de la sonda específica correspondiente para la región amplificada conjugada a fluoresceína. La mezcla se incubó a 95°C durante 5 min para desnaturalizar el ADN y luego 10 min a la respectiva T_H para hibridar la sonda (Tabla 6).

Tabla 6. Condiciones de hibridación para las sondas utilizadas.

Sistema de cebadores	Sonda	Concentración final de sonda	Temperatura de hibridación (T _H)
ALL-Fw/ALL-Rv	S-Gagp24	2 pmol/reacción	55°C
SK145/SKCC1B	SK102	2 pmol/reacción	55°C
SUD-F1/SUD-R1	S-Gagp24	2 pmol/reacción	55°C
Qβ-S/Qβ-AS	S-Qβ	2 pmol/reacción	55°C

Sucesivamente, se transfirieron 45 µl del producto de hibridación a los pocillos de las microplacas revestidas con estreptavidina. Así, el híbrido producto biotinilado-sonda fluoresceinada se capturó en la microplaca a través de la unión biotina-estreptavidina generadas en nuestro laboratorio. Luego de incubar la placa 1 h a 37°C, los productos no unidos fueron removidos mediante 8 lavados con Solución de Lavado (Polivinilpirrolidona 0,1%, Tween 20 0,01%). Posteriormente, se procedió a la detección de los productos de hibridación capturados en la microplaca con un anticuerpo anti-F (*Anti-Fluorescein-POD, Fab fragments*, Roche, Argentina). Para ello, se agregaron 100 µl de una dilución apropiada del anti-F preparada con la solución Diluyente del Anticuerpo (Tris-HCl pH 7,6 100 mM, NaCl 150 mM) a cada uno de los pocillos de la microplaca. La microplaca se incubó durante 30 min a temperatura ambiente con agitación. Finalmente se lavó para remover el conjugado no unido como descrito previamente. El revelado se realizó mediante reacción cromogénica en la que se adicionaron a cada pocillo una gota de H₂O₂ y una gota de tetrametilbencidina (Wiener Laboratories, Argentina). La reacción se frenó a los 30 min mediante el agregado de una gota de solución de H₂SO₄ 1M. El color obtenido se midió a 450 nm en un lector de microplacas (*Stat-Fax 2100, Awareness Technology Inc, EE.UU.*) usando un filtro de referencia de 630 nm.

3.7 AMPLIFICACIÓN DE SECUENCIAS DEL HIV-1 PARA INFERENCIA FILOGENÉTICA.

Se desarrollaron diversos ensayos basados en PCR para la amplificación de fragmentos génicos de los genes *gag*, *env*, *vif*, *nef* de los subtipos B y F conteniendo información filogenética para discriminar subtipos del HIV-1. Las reacciones de optimización se realizaron con los plásmidos pNL4-3 y p93BR020.1, respectivamente, ya sea utilizando sistemas de PCR simple como de PCR anidada en formato “gota colgante”. Esta última estrategia se aplicó para aumentar la sensibilidad de la reacción a fin de poder obtener bandas visibles luego de electroforesis en agarosa y, por lo tanto, secuenciables. La técnica de PCR de la gota colgante [del inglés, “*Hanging Droplet PCR*”] permite reducir el riesgo de contaminación al abrir los tubos en la segunda ronda de amplificación con un protocolo de PCR anidada [167] y fue aplicada en nuestro laboratorio para la detección del Virus del Papiloma Humano [166, 168] [169]. La técnica consiste en la preparación de dos mezclas de reacción: MIX I y MIX II. La MIX I se agrega en el fondo del tubo de PCR junto con la muestra y una gota de aceite mineral, mientras que la MIX II se agrega en el interior de la tapa del tubo. Ambas mezclas de reacción contienen todos los reactivos necesarios para la amplificación de forma que una vez cerrado el tubo no se vuelve a abrir en la segunda ronda de amplificación. La primera ronda de amplificación (Perfil I) se realiza sin calentar la tapa del termociclador para evitar la evaporización de la MIX II, mientras el aceite mineral evita la evaporación de la MIX I. Luego de la primera ronda de amplificación, el tubo de PCR se centrifuga 1 min a 12.000 rpm para poner en contacto la MIX II con la primera reacción y el conjunto es sometido a la segunda ronda de amplificación (Perfil II).

3.7.1 ENSAYOS DE AMPLIFICACIÓN PARA LA REGIÓN *gag* DEL HIV-1.

Se optimizó el sistema utilizando los cebadores GagSense (CS) y SUD-R1 (CAS) para amplificar un fragmento de aproximadamente 450 pb del gen *gag* del HIV-1 (Segmento externo: GAG_{EXT}).

3.7.1.1 Amplificación del ADN proviral del HIV-1.

PCR SIMPLE (PCR/GAG _{EXT})	PCR DE LA GOTA COLGANTE (PCRgt/GAG _{EXT})
Condiciones de reacción	
10 µl de lisado celular (10.000 PBMC) como molde, solución tampón 1X (Tris-HCl 10 mM pH 8,8; KCl 50 mM) – 2,0 mM de MgCl ₂ – 400 µM de dNTP – 0,6 µM de cada cebador – 2,5 U de ADN Taq Polimerasa y H ₂ O csp 50 µl.	MIX I: 5 µl de lisado celular (5.000 PBMC) como molde, solución tampón 1X (Tris-HCl 10 mM pH 8,8; KCl 50 mM) – 2,0 mM de MgCl ₂ – 200 µM de dNTP – 0,1 µM de cada cebador – 1 U de ADN Taq Polimerasa y H ₂ O csp 25 µl. MIX II: solución tampón 1X (Tris-HCl 10 mM pH 8,8; KCl 50 mM) – 2,0 mM de MgCl ₂ – 200 µM de dNTP – 0,6 µM de cada cebador – 2,5 U de ADN Taq Polimerasa y H ₂ O csp 25 µl.
Perfil Térmico	
desnaturalización inicial (5 min a 95°C) seguida de 5 ciclos de amplificación (40" a 95°C, 40" a 55°C y 40" a 72°C), 35 ciclos de amplificación (40" a 95°C, 40" a 52°C y 40" a 72°C) y síntesis final de 5 min a 72°C	Perfil I: desnaturalización inicial (5 min a 95°C) seguida de 20 ciclos de amplificación (45" a 95°C, 45" a 58°C y 45" a 72°C) y síntesis final de 5 min a 72°C. Perfil II: desnaturalización inicial (5 min a 95°C) seguida de 40 ciclos de amplificación (45" a 95°C, 45" a 55°C y 45" a 72°C) y síntesis final de 5 min a 72°C.

3.7.1.2 Amplificación del ARN del HIV-1.

Ensayo Cebadores	Condiciones de reacción	Perfil Térmico
RT CAS: SUD-R1	25 µl del eluato de ARN purificado a partir de 150 µl de plasma como molde, solución tampón 1X (Tris-HCl 10 mM pH 8,8; KCl 50 mM) – 2,0 mM de MgCl ₂ – 600 µM de dNTP – 0,6 µM del CAS – 20 U de RiboLock RNase Inhibitor – 40 U de RT-MMLV – H ₂ O csp 50 µl.	Incubación a 37°C durante 50 min seguida de la inactivación de la enzima RT-MMLV a 70°C durante 5 min.
PCR/GAG _{EXT} CS: GagSense	solución tampón 1X (Tris-HCl 10 mM pH 8,8; KCl 50 mM) – 2,0 mM de MgCl ₂ – 0,6 µM del CS – 2,5 U de ADN Taq Polimerasa y H ₂ O csp 100 µl.	desnaturalización inicial (2 min a 95°C) seguida de 5 ciclos de amplificación (40" a 95°C, 40" a 55°C y 40" a 72°C), 35 ciclos de amplificación (40" a 95°C, 40" a 52°C y 40" a 72°C) y síntesis final de 2 min a 72°C.

3.7.2 ENSAYOS DE AMPLIFICACIÓN PARA LA REGIÓN *vif* DEL HIV-1.

Se optimizó el sistema utilizando los cebadores VIF102 (CS) y VIF301 (CAS) para amplificar un fragmento de aproximadamente 450 pb del gen *vif* del HIV-1 (Segmento externo: VIF_{EXT}).

3.7.2.1 Amplificación del ADN proviral del HIV-1.

PCR SIMPLE (PCR/VIF _{EXT})	PCR DE LA GOTA COLGANTE (PCRgt/VIF _{EXT})
Condiciones de reacción	
10 µl de lisado celular (10.000 PBMC) como molde solución tampón 1X (Tris-HCl 10 mM pH 8,8; KCl 50 mM) – 2,5 mM de MgCl ₂ – 400 µM de dNTP – 0,6 µM de cada cebador – 2,5 U de ADN Taq Polimerasa y H ₂ O csp 50 µl.	MIX I: 5 µl de lisado celular (5.000 PBMC) como molde, solución tampón 1X (Tris-HCl 10 mM pH 8,8; KCl 50 mM) – 2,5 mM de MgCl ₂ – 100 µM de dNTP – 0,06 µM de cada cebador – 1 U/µl de ADN Taq Polimerasa y H ₂ O csp 25 µl. MIX II: solución tampón 1X (Tris-HCl 10 mM pH 8,8; KCl 50 mM) – 2,0 mM de MgCl ₂ – 400 µM de dNTP – 0,6 µM de cada cebador – 2,5 U de ADN Taq Polimerasa y H ₂ O csp 25 µl.
Perfil Térmico	
desnaturalización inicial (5 min a 95°C) seguida de 5 ciclos de amplificación (30" a 95°C, 30" a 55°C y 30" a 72°C), 35 ciclos de amplificación (30" a 95°C, 30" a 50°C y 30" a 72°C) y síntesis final de 5 min a 72°C	Perfil I: desnaturalización inicial (5 min a 95°C) seguida de 20 ciclos de amplificación (30" a 95°C, 30" a 55°C y 30" a 72°C) y síntesis final de 5 min a 72°C. Perfil II: desnaturalización inicial (5 min a 95°C) seguida de 40 ciclos de amplificación (30" a 95°C, 30" a 50°C y 30" a 72°C) y síntesis final de 5 min a 72°C.

3.7.2.2 Amplificación del ARN del HIV-1.

Ensayo Cebadores	Condiciones de reacción	Perfil Térmico
RT CAS: VIF301	25 µl del eluato de ARN purificado a partir de 150 µl de plasma como molde, solución tampón 1X (Tris-HCl 10 mM pH 8,8; KCl 50 mM) – 2,0 mM de MgCl ₂ – 600 µM de dNTP – 0,6 µM del CAS – 20 U de RiboLock RNase Inhibitor – 40 U de RT-MMLV– H ₂ O csp 50 µl.	Incubación a 37°C durante 50 min seguida de la inactivación de la enzima RT-MMLV a 70°C durante 5 min.
PCR CS: VIF102	solución tampón 1X (Tris-HCl 10 mM pH 8,8; KCl 50 mM) – 2,0 mM de MgCl ₂ – 0,6 µM del CS – 2,5 U de ADN Taq Polimerasa y H ₂ O csp 100 µl.	desnaturalización inicial (2 min a 95°C) seguida de 5 ciclos de amplificación (40" a 95°C, 40" a 55°C y 40" a 72°C), 35 ciclos de amplificación (40" a 95°C, 40" a 52°C y 40" a 72°C) y síntesis final de 2 min a 72°C.

3.7.3 ENSAYOS DE AMPLIFICACIÓN PARA LA REGIÓN *nef* DEL HIV-1.

Se optimizó el sistema multiplex utilizando los cebadores NEF-F1 (CS) y NEF-R1 (CAS) para amplificar un fragmento de aproximadamente 450 pb del gen *nef* del HIV-1 (Segmento externo: NEF_{EXT}).

3.7.3.1 Amplificación del ADN proviral del HIV-1.

PCR SIMPLE (PCR/NEF _{EXT})	PCR DE LA GOTA COLGANTE (PCR _{gt} /NEF _{EXT})
Condiciones de reacción	
10 µl de lisado celular (10.000 PBMC) como molde solución tampón 1X (Tris-HCl 10 mM pH 8,8; KCl 50 mM) – 2,5 mM de MgCl ₂ – 200 µM de dNTP – 0,6 µM del CAS y 0,6 µM del CS – 2,5 U de ADN Taq Polimerasa y H ₂ O csp 50 µl.	MIX I: 5 µl de lisado celular (5.000 PBMC) como molde, solución tampón 1X (Tris-HCl 10 mM pH 8,8; KCl 50 mM) – 1,5 mM de MgCl ₂ – 100 µM de dNTP – 0,2 µM de cada CAS – 1 U de ADN Taq Polimerasa y H ₂ O csp 25 µl. MIX II: solución tampón 1X (Tris-HCl 10 mM pH 8,8; KCl 50 mM) – 1,5 mM de MgCl ₂ – 200 µM de dNTP – 0,4 µM de cada CAS – 2,5 U de ADN Taq Polimerasa y H ₂ O csp 25 µl.
Perfil Térmico	
desnaturalización inicial (5 min a 95°C) seguida de 5 ciclos de amplificación (40" a 95°C, 40" a 58°C y 40" a 72°C), 35 ciclos de amplificación (40" a 95°C, 40" a 55°C y 40" a 72°C) y síntesis final de 5 min a 72°C	Perfil I: desnaturalización inicial (5 min a 95°C) seguida de 5 ciclos de amplificación (40" a 95°C, 40" a 58°C y 40" a 72°C), 15 ciclos de amplificación (40" a 95°C, 40" a 55°C y 40" a 72°C) y síntesis final de 5 min a 72°C. Perfil II: desnaturalización inicial (5 min a 95°C) seguida de 10 ciclos de amplificación (40" a 95°C, 40" a 55°C y 40" a 72°C), 30 ciclos de amplificación (40" a 95°C, 40" a 52°C y 40" a 72°C) y síntesis final de 5 min a 72°C.

3.7.3.2 Amplificación del ARN del HIV-1.

Ensayo Cebadores	Condiciones de reacción	Perfil Térmico
RT CAS: NEF-R1	25 µl del eluato de ARN purificado como molde, solución tampón 1X (Tris-HCl 10 mM pH 8,8; KCl 50 mM) – 2,0 mM de MgCl ₂ – 600 µM de dNTP – 0,6 µM del CAS – 20 U de RiboLock RNase Inhibitor – 40 U de RT-MMLV– H ₂ O csp 50 µl.	Incubación a 37°C durante 50 min seguida de la inactivación de la enzima RT-MMLV a 70°C durante 5 min.
PCR CS: NEF-F1	solución tampón 1X (Tris-HCl 10 mM pH 8,8; KCl 50 mM) – 2,0 mM de MgCl ₂ – 0,6 µM del CS – 2,5 U de ADN Taq Polimerasa y H ₂ O csp 100 µl.	desnaturalización inicial (2 min a 95°C) seguida de 5 ciclos de amplificación (40" a 95°C, 40" a 55°C y 40" a 72°C), 35 ciclos de amplificación (40" a 95°C, 40" a 52°C y 40" a 72°C) y síntesis final de 2 min a 72°C.

3.8 AMPLIFICACIÓN DE SECUENCIAS DEL HIV-1 PARA TIPIFICACIÓN EN SUBTIPOS.

Para todas las reacciones de amplificación se utilizó el termociclador *StepOne™ Real-Time PCR Systems* (Life Technologies, EE.UU.) Los cebadores utilizados se detallan en el Anexo 3. En las reacciones enzimáticas se utilizaron los reactivos de los siguientes proveedores: i) Mezcla Real 2x (Biodynamics SRL, Argentina), y ii) cebadores (Sigma-Aldrich, EE.UU.).

Ensayo Cebadores	Condiciones de reacción	Perfil Térmico
qPCR/GAG_{INT} CS: GagSense CAS: Gag-X	1 µl de cada plásmido conteniendo el segmento GAG _{EXT} obtenido de las muestras clínicas analizadas como molde, mezcla real 1X – 2,5 mM de MgCl ₂ – 0,375 µM de cada cebador – H ₂ O csp 25 µl.	desnaturalización inicial (2 min a 95°C) seguida de 35 ciclos de amplificación (25" a 95°C, 25" a 55°C y 25" a 72°C), síntesis final de 2 min a 72°C, y curva de disociación de 60°C a 95°C (rampa de 0,3°C).
qPCR/VIF_{INT} CS: VIF-F2 CAS: VIF301	1 µl de cada plásmido conteniendo el segmento VIF _{EXT} obtenido de las muestras clínicas analizadas como molde, mezcla real 1X – 2,5 mM de MgCl ₂ – 0,375 µM de cada cebador – H ₂ O csp 25 µl.	desnaturalización inicial (2 min a 95°C) seguida de 35 ciclos de amplificación (25" a 95°C, 25" a 55°C y 25" a 72°C), síntesis final de 2 min a 72°C, y curva de disociación de 60°C a 95°C (rampa de 0,3°C).
qPCR/NEF_{INT} CS: NEF-F2 CAS: NEF-R1	1 µl de cada plásmido conteniendo el segmento NEF _{EXT} obtenido de las muestras clínicas analizadas como molde, mezcla real 1X – 2,5 mM de MgCl ₂ – 0,375 µM de cada cebador – H ₂ O csp 25 µl.	desnaturalización inicial (2 min a 95°C) seguida de 35 ciclos de amplificación (25" a 95°C, 25" a 55°C y 25" a 72°C), síntesis final de 2 min a 72°C, y curva de disociación de 60°C a 95°C (rampa de 0,3°C).

3.9 HERRAMIENTAS BIOINFORMÁTICAS.

3.9.1 DISEÑO DE CEBADORES Y SONDAS.

Para este trabajo de tesis se utilizaron los compendios de secuencias del HIV-1 reunidas en la base de datos de *Los Alamos National Laboratory* (www.hiv.lanl.gov/content/index) y el *"National Center for Biotechnology Information"* (www.ncbi.nlm.nih.gov). Los cromatogramas de las secuencias derivadas de la amplificación con los sistemas PCR/GAG_{EXT}, PCR/VIF_{EXT}, y PCR/NEF_{EXT} fueron analizados con el programa *"BioEdit 7.2.0"* [170] disponible en <http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>. Los alineamientos de las secuencias nucleotídicas se realizaron con el programa *"Clustal X 2.0"* [171] disponible en <http://www.clustal.org/> y se depuraron manualmente con el programa BioEdit.

El análisis de los cebadores se llevó a cabo con los programas *Oligo Explorer* y *Oligo Analyzer* disponibles en (http://molbiol-tools.ca/molecular_biology_freeware.htm), y la herramienta *Primer-BLAST* [172] del *"National Center for Biotechnology Information"* disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>.

3.9.2 INFERENCIA FILOGENÉTICA.

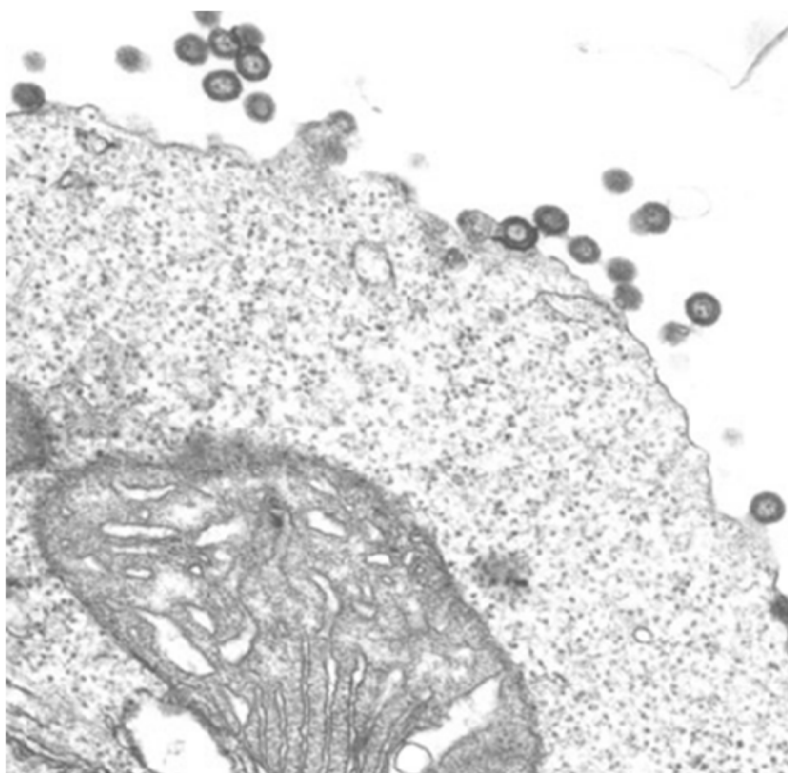
Para la identificación del modelo de evolución molecular o de sustitución nucleotídica se utilizó el programa “JModelTest 2” [173] disponible en <https://code.google.com/p/jmodeltest2/>. Para la construcción de los árboles filogenéticos basados en inferencia bayesiana se utilizó el paquete Beast v1.7.5 [174] disponible en <http://beast.bio.ed.ac.uk>. La distribución de probabilidad posterior fue calculada utilizando las cadenas Markov-Monte Carlo. La convergencia de los parámetros se evaluó calculando el tamaño efectivo de la muestra (ESS) usando TRACER v1.4 disponible en <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>, luego de excluir el 10% de los árboles iniciales en cada corrida. Todos los parámetros estimados mostraron valores de ESS mayores a 100. Se obtuvo el árbol consenso usando el programa TreeAnnotator v1.4.7 disponibles en <http://beast.bio.ed.ac.uk>. Los árboles fueron visualizados usando el programa FigTree v1.1.2 disponible en <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>.

3.9.3 NÚMEROS DE ACCESO EN EL GENBANK.

Los números de acceso en el GenBank de las secuencias de los segmentos externos correspondientes a los genes *gag*, *vif* y *nef* identificados en este trabajo son los siguientes:

GAG.V02 (KJ888856), GAG.V04 (KJ888857), GAG.V05 (KJ888858), GAG.V06 (KJ888859), GAG.V07 (KJ888860), GAG.V08 (KJ888861), GAG.V10 (KJ888862), GAG.V11 (KJ888863), GAG.V12 (KJ888864), GAG.V13 (KJ888865), GAG.V14 (KJ888866), GAG.V15 (KJ888867), GAG.V17 (KJ888868), GAG.V18 (KJ888869), GAG.V19 (KJ888870), GAG.V20 (KJ888871), GAG.V21 (KJ888872), GAG.V22 (KJ888873), GAG.V23 (KJ888874), GAG.V25 (KJ888875), GAG.V27 (KJ888876), GAG.V30 (KJ888877), GAG.V31 (KJ888878), GAG.V33 (KJ888879), GAG.W118 (KJ888880), GAG.W120 (KJ888881), GAG.W140 (KJ888882), GAG.W142 (KJ888883), GAG.W144 (KJ888884), GAG.W148 (KJ888885), GAG.W149 (KJ888886), GAG.W150 (KJ888887), GAG.W151 (KJ888888), GAG.W274 (KJ888889), GAG.W275 (KJ888890), GAG.W281 (KJ888891), GAG.W497 (KJ888892), GAG.W507 (KJ888893), GAG.W518 (KJ888894), GAG.W522 (KJ888895), GAG.W526 (KJ888896), GAG.W529 (KJ888897), GAG.W531 (KJ888898), GAG.W535 (KJ888899), GAG.W536 (KJ888900), GAG.W537 (KJ888901), GAG.W547 (KJ888902), GAG.W548 (KJ888903), GAG.W550 (KJ888904), GAG.W552 (KJ888905), GAG.W553 (KJ888906), VIF.V06 (KJ888927), VIF.V11 (KJ888928), VIF.V14 (KJ888929), VIF.V15 (KJ888930), VIF.V17 (KJ888931), VIF.V18 (KJ888932), VIF.V22 (KJ888933), VIF.V23 (KJ888934), VIF.V25 (KJ888936), VIF.V26 (KJ888935), VIF.V31 (KJ888937), VIF.V33 (KJ888938), NEF.V02 (KJ888907), NEF.V04 (KJ888908), NEF.V05 (KJ888909), NEF.V07 (KJ888910), NEF.V08 (KJ888911), NEF.V12 (KJ888912), NEF.V13 (KJ888913), NEF.V14 (KJ888914), NEF.V15 (KJ888915), NEF.V18 (KJ888916), NEF.V19 (KJ888917), NEF.V20 (KJ888918), NEF.V21 (KJ888919), NEF.V22 (KJ888920), NEF.V23 (KJ888921), NEF.V25 (KJ888922), NEF.V27 (KJ888923), NEF.V30 (KJ888924), NEF.V31 (KJ888925), NEF.V33 (KJ888926).

4. RESULTADOS

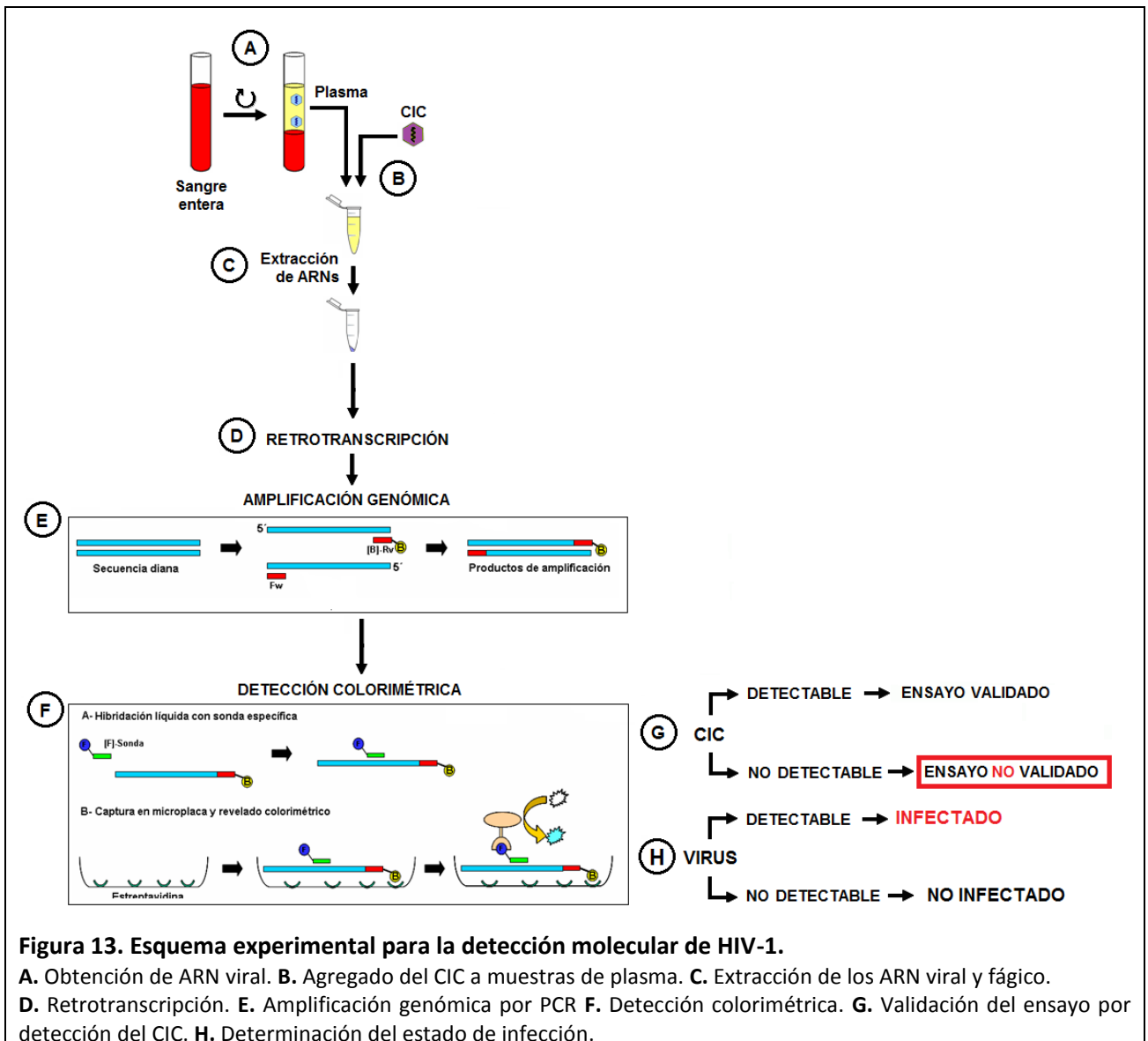


4.1 DESARROLLO DE UN ENSAYO PARA EL TAMIZAJE MOLECULAR DEL HIV-1

4.1.1 DISEÑO EXPERIMENTAL.

La gran diversidad genómica del HIV-1 plantea un desafío en el diagnóstico molecular de la infección, ya que todas las plataformas comerciales se estandarizaron usando como referencia aquellas cepas del HIV-1, fundamentalmente el subtipo B, que eran las más prevalentes en los países industrializados. Sin embargo, como fue expuesto en la introducción, estas cepas no necesariamente son las predominantes en la epidemia del HIV-1 a nivel regional. Esta situación impone la necesidad de disponer de herramientas moleculares adecuadas, diseñadas en base a las cepas circulantes en una región, a fin de garantizar el diagnóstico de la infección, que al momento no dispone de vacunas preventivas ni de tratamientos que logren la erradicación del virus.

En este trabajo de tesis se diseñó una herramienta diagnóstica en base a las cepas circulantes del HIV-1 en nuestra región para la detección temprana de la infección y aplicable al tamizaje molecular de donantes de sangre que consta de las siguientes etapas analíticas (Figura 13):



1. Obtención de los ácidos nucleicos a partir de la muestra clínica: A partir de sangre entera anticoagulada con EDTA se separa el plasma por centrifugación [A]. A una alícuota de plasma se le adiciona una cantidad adecuada del CIC [B] y se procede a la lisis y extracción de los ARNs (ARN viral y ARN fágico) [C].
2. Amplificación genómica: Los ARNs purificados son retrotranscriptos [D], y a partir de ADNc se realiza una PCR con un único par de cebadores utilizando el CAS conjugado a biotina en el extremo 5'. Los productos amplificados obtenidos son biotinilados por la inclusión del CAS [E].
3. Hibridación en fase líquida con sondas y detección colorimétrica [F]: En esta etapa se discriminan y detectan los amplicones obtenidos con el siguiente procedimiento: *i)* hibridación en fase líquida de los productos amplificados biotinilados con sondas conjugadas a fluoresceína en el extremo 5' específicas para cada producto (HIV-1 y CIC); *ii)* captura de los híbridos en una microplaca revestida con estreptavidina; *iii)* detección con un anticuerpo anti-Fluoresceína y un substrato cromóforo; *iv)* lectura de producción de color por medida de densidad óptica (DO) en lector de microplacas a 450 nm con filtro de referencia a 630 nm.

La positividad o negatividad de los resultados se determina en base al VC, que en este trabajo se calculó en cada experimento como el doble de la media de los valores de las DO obtenidas en los CN luego de la detección colorimétrica más un valor de 0,1 ($VC = [\bar{X}_{DO,CN} \times 2] + 0,1$) para cada target en evaluación. Así, una dada muestra que arroje valores de DO positivos para el CIC indicará que el ARN viral fue extraído exitosamente y que no contiene inhibidores de la reacción [G]. Por otro lado, el valor de DO obtenido en esa muestra con la sonda específica para el HIV-1 permite establecer el estado de infección [H].

En esta sección se describen las actividades realizadas para definir los oligonucleótidos candidatos como cebadores y sondas para la detección de las cepas de HIV-1 a ser utilizados en el ensayo en desarrollo y en el sistema de referencia, y para la construcción de los CICs correspondientes.

4.1.2 DISEÑO DE CEBADORES Y SONDA PARA EL ENSAYO DE DETECCIÓN DE HIV-1 EN DESARROLLO.

Debido la amplia variabilidad nucleotídica de las secuencias de HIV-1, el diseño de los cebadores requirió de especial atención. En primera instancia, analizamos las secuencias de la región *gag* (posiciones 790 - 2292 nt referidas a la cepa de referencia HXB2) de los distintos subtipos y formas recombinantes del HIV-1 circulantes a nivel mundial descriptos hasta el momento y que se hallan informadas en los bancos de datos provistos por el “*National Center for Biotechnology Information*” (www.ncbi.nlm.nih.gov) y “*Los Alamos National Laboratory*” (<http://www.hiv.lanl.gov>). La elección de esta región se debió a que este segmento génico es el más conservado en el genoma del HIV-1 y es el

elegido por la mayoría de los laboratorios biotecnológicos abocados al desarrollo de ensayos comerciales [157, 175-178], como se detalla en la Tabla 7.

Como resultado de este análisis, se trabajó con un apilamiento de 1.745 secuencias nucleotídicas de la región *gag* generado por procesos iterativos con el programa “*Clustal X 2.0*” y edición manual con el programa “*BioEdit 7.2.0*” para facilitar el análisis. Para la elección de los cebadores candidatos se utilizaron los programas *Oligo Explorer* y *Oligo Analyzer* para analizar la formación de homodímeros y heterodímeros como así también las estructuras “*hairpins*”. Para evaluar la especificidad de los cebadores se utilizó la herramienta *Primer-BLAST*.

Tabla 7. Ejemplos de cebadores utilizados por empresas biotecnológicas para la detección del HIV-1.

Nombre del Cebador	Función	Secuencia 5' - 3'	Posición ^[*]	Tecnología	Ensayo
SK145 ^[157]	CS	AGTGGGGGGACATCAAGCAGCCATGCAAAT	1359 → 1388	RT-PCR	AMPLICOR HIV-1 MONITOR v 1.5 (Roche Diagnostics, NJ)
SKCC1B ^[157]	CAS	GGAAGTGACA TAGCAGGAAGTACTAGTA	1486 → 1513	RT-PCR	
Primer 1 ^[175]	CS	GTACCCTTCAGGAACAAATA	1511 → 1530	NASBA	NucliSens HIV-1 QT assay (bioMérieux, NL)
Primer 2 ^[175]	CAS	AGTGGGGGGACATCAAGCAGCCATGCAAA	1359 → 1387	NASBA	
5'SNASBap ^[176]	CS	CAGACAGGAACAGAGGAAGT	994 → 1013	<i>real time</i> NASBA	RETINA® (Primagen Holding, NL)
3'ASNASBap ^[176]	CAS	AGCTTTAGACAAGATAGAGGAAG	1086 → 1107	<i>real time</i> NASBA	
Primer 1 ^[178]	CS	GGGGGGACATCAAGCAGCCATGCAAA	1362 → 1387	NASBA	NASBA-FCS technique. (Max Planck Inst., DE)
Primer 2 ^[178]	CAS	TGAGAGAACCAAGGGGAAGTGACATAGCAC	1472 → 1501	NASBA	

CS: Cebador Sentido; CAS: cebador Anti-Sentido
^[*] Posición nucleotídica referida a la cepa B.FR.83.HXB2 (N° GenBank: K03455)

Por medio de estas herramientas se seleccionaron dos pares de cebadores: el par **ALL** (cebadores **ALL-Fw/ALL-Rv**, Anexo 3), diseñado en base a las secuencias correspondientes a los subtipos y los CRFs de referencia del grupo M destinado a cubrir el espectro de cepas circulantes a nivel global, y el par **SUD** (cebadores **SUD-F1/SUD-R1**, Anexo 3), diseñado en base a las secuencias reportadas para los subtipos y CRFs circulantes en los países del cono sur (Argentina, Brasil, Uruguay, Bolivia y Chile) propuesto para abarcar el espectro de cepas circulantes a nivel regional. Ambos pares de cebadores amplifican un fragmento de aproximadamente 132 pb [1399 → 1530 nt referida a la cepa HXB2].

Para el diseño de los cebadores ALL se contempló la introducción de degeneraciones en las posiciones con mayor variabilidad de forma de poder alcanzar el mínimo número de bases desapareadas (*mismatch*) entre los cebadores y las distintas secuencias de HIV-1 para los subtipos y CRFs de referencia. Esto se realizó debido a que teóricamente cuanto menos bases desapareadas presenten los cebadores respecto a la secuencia molde, más eficiente sería la reacción de amplificación génica y/o permitiría la identificación de una mayor cantidad de subtipos y CRFs de HIV-1. Por otro lado, en los cebadores SUD no se

introdujeron degeneraciones en la secuencia, priorizando el mínimo número de bases desapareadas (*mismatch*) con las distintas secuencias de HIV-1 circulantes en la región.

En paralelo, se seleccionó una región interna conservada entre la secuencia delimitada por ambos pares de cebadores para el diseño de una sonda común, utilizando el mismo criterio que el empleado para el diseño de los cebadores. La sonda **S-Gagp24**, cuya secuencia nucleotídica se detalla en el Anexo 3, fue desarrollada con el objetivo de aumentar la sensibilidad del ensayo mediante detección colorimétrica con un formato de EIA y comprobar la especificidad de los productos amplificados por los cebadores ALL o SUD.

4.1.2.1 ANÁLISIS DE LOS CEBADORES ALL Y SUD.

Para analizar el número de bases desapareadas en los cebadores y la sonda, respecto a las secuencias de HIV-1 alineadas, se utilizaron planillas Excel. En el Anexo 4A se muestra el alineamiento de los cebadores y sonda seleccionados con los subtipos de referencia para el HIV-1 grupo M y las CRFs de referencia. Esta base de datos de 158 secuencias se formó con la selección de 4 genomas completos, como máximo, representativos de la diversidad nucleotídica para cada subtipo y CRF [179]. En la Tabla 8 se comparan los cebadores sentido (ALL-Fw vs SUD-F1) y antisentido (ALL-Rv vs SUD-R1) y se detalla la diferencia en el número de *mismatch* que presentan entre sí con respecto a las secuencias de HIV-1 de referencia. Se puede observar que para:

- los cebadores sentido ALL-Fw vs SUD-F1: no presentan entre sí diferencias en el número de *mismatch* para los subtipos y CRFs que circulan en la región (B, F1, 12_BF, 17_BF, 28_BF, 29_BF, 31_BC, 38_BF1, 39_BF, 40_B, 44_BF y 46_BF), por lo que se concluye que ambos tendrían idéntica especificidad de hibridación con las secuencias de referencia.
- los cebadores antisentido ALL-Rv vs SUD-R1: solo con la cepa recombinante CRF46_BF se observa la diferencia de un *mismatch* en algunas de las secuencias de referencia (DQ358801 y DQ358802), mientras que para el resto de los subtipos y CRFs presentes en la región (B, F1, 12_BF, 17_BF, 28_BF, 29_BF, 31_BC, 38_BF1, 39_BF, 40_B y 44_BF) no se observan diferencias en el número de *mismatch*. Por lo tanto, se concluye que ambos cebadores podrían hibridar con la mayoría de las secuencias de referencia en idénticas condiciones.

Por otro lado, el Anexo 4B muestra el alineamiento de los cebadores y sonda seleccionados con las cepas aisladas en la región: i) subtipos B, C y F1, ii) CRFs 12_BF, 17_BF, 28_BF, 29_BF, 31_BC, 38_BF1, 39_BF, 40_B, 44_BF y 46_BF, y iii) URFs BC, BCF1, BF y BF1. Esta base de datos se compuso de alineamientos de 180 genomas completos en donde: i) se incluyó solo una secuencia por paciente, ii) se eliminaron las secuencias homólogas determinadas en base a la distribución de la distancia genética, y iii) no se consideraron las secuencias problemáticas (secuencias con alta cantidad de caracteres no-ACGT, con deleciones mayores a 100 nucleótidos, hipermutadas, sintéticas, etc) [179].

Tabla 8. Comparación entre la especificidad teórica de los cebadores ALL vs SUD respecto a las cepas de referencia del HIV-1. Los subtipos y CRFs circulantes en la región (Argentina, Uruguay, Chile y Brasil) se resaltan en letra negrita.

Diferencia de mismatch entre ambos cebadores	Cebadores sentido (ALL-Fw vs SUD-F1)			Cebadores antisentido (ALL-Rv vs SUD-R1)		
	Cepas de HIV-1	Total de subtipos y CRFs	Nº secuencias	Cepas de HIV-1	Total de subtipos y CRFs	Nº secuencias
SECUENCIAS CON MISMATCHES COMPARTIDOS POR TODAS LAS CEPAS DEL GRUPO						
0	<u>Subtipos:</u> A1, A2, B , D, F1 y H. <u>CRFs:</u> 01_AE, 02_AG, 03_AB, 10_CD, 12_BF , 15_01B, 16_A2D, 17_BF , 19_cpx, 21_A2D, 22_01A1, 28_BF , 29_BF , 31_BC , 32_06A1, 33_01B, 34_01B, 36_cpx, 37_cpx, 38_BF1 , 39_BF , 40_B , 42_BF, 44_BF , 45_cpx, 46_BF , 47_BF y 49_cpx.	34	91	<u>Subtipos:</u> A2, B , C, D, F1 , F2 y J. <u>CRFs:</u> 05_DF, 06_cpx, 07_BC, 10_CD, 12_BF , 16_A2D, 17_BF , 19_cpx, 20_BG, 21_A2D, 23_BG, 24_BG, 25_cpx, 26_AU, 28_BF , 29_BF , 31_BC , 38_BF1 , 39_BF , 40_BF , 42_BF, 44_BF y 47_BF.	30	84
1	<u>Subtipos:</u> C, G y K. <u>CRFs:</u> 13_cpx, 14_BG, 20_BG, 23_BG, 24_BG y 27_cpx.	9	24	<u>Subtipos:</u> G. <u>CRFs:</u> 01_AE, 02_AG, 03_AB, 04_cpx, 08_BC, 09_cpx, 11_cpx, 13_cpx, 14_BG, 15_01B, 18_cpx, 22_01A1, 32_06A1, 33_01B, 34_01B, 36_cpx y 37_cpx.	17	44
2	<u>Subtipos:</u> -- <u>CRFs:</u> 07_BC, 08_BC y 43_02G.	3	8	<u>Subtipos:</u> A1 <u>CRFs:</u> 35_AD	2	6
SECUENCIAS CON MISMATCHES COMPARTIDOS POR ALGUNAS DE LAS CEPAS DEL GRUPO						
1	<u>Subtipos:</u> J. <u>CRFs:</u> 04_cpx, 05_DF, 06_cpx, 09_cpx, 11_cpx, 18_cpx, 25_cpx, 26_AU y 35_AD.	10	31	<u>Subtipos:</u> H y K <u>CRFs:</u> 27_cpx, 43_02G, 45_cpx y 46_BF .	6	17
2	<u>Subtipos:</u> F2. <u>CRFs:</u> ---	1	4	<u>Subtipos:</u> F2 <u>CRFs:</u> 49_cpx.	2	7
		57	158		57	158

En la Tabla 9 se comparan los cebadores sentido (A) y antisentido (B) con esta base de datos y se detallan las diferencias en el número de *mismatch* que presentan entre sí con respecto a las secuencias de HIV-1 seleccionadas. Se puede observar que:

- los cebadores sentido ALL-Fw vs SUD-F1: el 80% (144/180) de las secuencias no presentan diferencias entre sí en el número de *mismatch* para las cepas que circulan en la región, mientras que el 18% (33/180) y el 2% (3/180) presenta uno y dos *mismatches* con algunas de las secuencias seleccionadas, respectivamente. En base a esto, se concluye que ambos cebadores tendrían especificidad de hibridación similar entre sí con las secuencias locales.
- los cebadores antisentido ALL-Rv vs SUD-R1: el 92% (166/180) de las secuencias no presentan diferencias entre sí en el número de *mismatch* para las cepas que circulan en la región, mientras que el 8% restante (14/180) presenta un *mismatch* en algunas de las secuencias seleccionadas. En base a esto, se concluye que ambos cebadores podrían hibridar con la mayoría de las secuencias adecuadamente.

4.1.2.1 ANÁLISIS DE LA SONDA S-Gagp24.

Del análisis del número de bases desapareadas en la sonda, con respecto a las secuencias de HIV-1 alineadas, se puede observar que:

- los subtipos de referencia del HIV-1 grupo M y las CRFs de referencia (Anexo 4A): el 83% (131/158) de las secuencias no presentan *mismatch* con la sonda, mientras que en el 16% (25/158) poseen un único *mismatch* y solo el 1% restante (2/158) tiene dos *mismatches*.
- para los subtipos y las CRFs del HIV-1 aislados en la región (Anexo 4B): el 91% (163/180) de las secuencias no presentan *mismatch* con la sonda, e incluyen todas las secuencias del subtipo C y de las CRFs 12_BF, 29_BF, 31_BC, 39_BF, 40_BF y 44_BF, el 93% (5/77) de las cepas del subtipo B, el 87% (7/8) del subtipo F1, el 75% (3/4) de la CRF17_BF, el 80% (4/5) de las CRF28_BF y CRF38_BF, el 86% (6/7) de la CRF46_BF, el 78% (7/9) de las URF_BF y el 83% (20/24) de las URF_BF1. El resto de las cepas presentan solo un *mismatch* en sus secuencias con respecto a la sonda diseñada.

4.1.3 OPTIMIZACIÓN DE LA AMPLIFICACIÓN DE HIV-1 CON LOS CEBADORES ALL Y SUD.

Una vez seleccionados y diseñados ambos pares de cebadores y sonda para los ensayos de tamizaje molecular de HIV-1 en evaluación se procedió a optimizar las condiciones de reacción para las amplificaciones correspondientes. Si bien el objetivo final de este trabajo era el desarrollo de un sistema de amplificación de ARN del HIV-1, en esta etapa las optimizaciones se realizaron en un formato de PCR con detección colorimétrica a fin de minimizar los costos y los tiempos requeridos, para luego adaptar las condiciones finales a RT-PCR.

Tabla 9. Comparación entre la especificidad teórica de los cebadores ALL vs SUD respecto a las cepas del HIV-1 aisladas en la región (Argentina, Uruguay, Chile y Brasil).

A. Cebadores sentido: ALL-Fw vs SUD-F1.

Número de <i>mismatch</i> entre ambos cebadores	Subtipos		CRFs												URFs				N° total de secuencias por <i>mismatch</i>
	B	C	F1	12_BF	17_BF	28_BF	29_BF	31_BC	38_BF	39_BF	40_B	44_BF	46_BF	48_BF	_BC	_BCF1	_BF	_BF1	
0	66	---	7	5	4	5	5	---	4	3	4	1	7		2	1	9	21	144
1	10	6	1	---	---	---	2	3	1	---	---	---	---		6	---	---	3	33
2	1	2	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---		---	---	---	---	3
N° total de secuencias por subtipo o CRF	77	8	9	5	4	5	7	3	5	3	4	1	7		8	1	9	24	180

B. Cebadores antisentido: ALL-Rv vs SUD-R1.

Número de <i>mismatch</i> entre ambos cebadores	Subtipos		CRFs												URFs				N° total de secuencias por <i>mismatch</i>
	B	C	F1	12_BF	17_BF	28_BF	29_BF	31_BC	38_BF	39_BF	40_B	44_BF	46_BF	48_BF	_BC	_BCF1	_BF	_BF1	
0	75	7	5	3	3	5	7	3	5	3	4	1	5		8	1	7	23	166
1	2	1	3	2	1	---	---	---	---	---	---	---	2		---	---	2	1	14
2	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---		---	---	---	---	0
N° total de secuencias por subtipo o CRF	77	8	9	5	4	5	7	3	5	3	4	1	7		8	1	9	24	180

Durante el proceso de optimización se utilizaron diluciones de los plásmidos pNL4-3 y p93BR020.1, gentilmente cedidos por el Dr. Manuel Gómez Carrillo (Instituto de Investigaciones Biomédicas en Retrovirus y SIDA, CABA). Las diluciones plasmídicas fueron preparadas en una matriz de ADN de placenta humana para mimetizar muestras conteniendo los subtipos B y F, respectivamente, y muestras de PBMC derivadas de individuos positivos y negativos para HIV-1 de la colección del laboratorio. Además se utilizó en cada experimento agua estéril como CR y ADN de placenta humana como CN. El criterio utilizado para determinar las condiciones adecuadas de amplificación y detección colorimétrica fue el de seleccionar aquéllas condiciones que arrojaran los máximos valores de DO en los CP (plásmidos de referencia y/o PBMC HIV-positivos) y mínimos valores de DO en los CR y en los CN (ADN de placenta y/o PBMC HIV-negativos).

4.1.3.1 CONDICIONES DE AMPLIFICACIÓN CON LOS CEBADORES ALL.

Como mencionamos previamente, el sistema de cebadores ALL fue concebido con el objetivo de amplificar un amplio espectro de subtipos y CRFs del grupo M del HIV-1, por lo que fue necesario introducir en su diseño un número discreto de bases degeneradas. Este tipo de diseño, sin embargo, requiere que se logren condiciones de amplificación en las que se favorezca la amplificación específica del HIV-1, evitando las amplificaciones inespecíficas, por ejemplo, de ADN humano. Por estos motivos, para determinar la composición óptima del buffer de la reacción de PCR y la concentración de $MgCl_2$ se utilizaron 16 soluciones de *buffers* 10X con composición salina provistas por KCl y diferentes condiciones de pH, y concentraciones de $MgCl_2$ a fin de hallar las condiciones adecuadas de amplificación. Se prepararon mezclas de reacción conteniendo 5 μ l de solución de cada *buffer* 10X en evaluación, 0,6 μ M de cada cebador ALL-Fw y ALL-Rv, 400 μ M de dNTPs, 2,5 U de ADN Taq Polimerasa, 5.000 copias/reacción de cada plásmido como molde y H_2O csp 50 μ l. La amplificación se realizó con las siguientes condiciones de ciclado: desnaturalización inicial (2 min a 95°C) seguida de 5 ciclos de amplificación (20" a 95°C, 20" a 48°C y 20" a 72°C), 40 ciclos de amplificación (20" a 95°C, 20" a 42°C y 20" a 72°C) y síntesis final de 5 min a 72°C.

La especificidad de los productos amplificados por los cebadores ALL se determinó mediante hibridación líquida a la sonda S-Gagp24 a una temperatura de hibridación (T_H) de 55°C y detección colorimétrica. Los resultados obtenidos (Tabla 10) indicaron que las condiciones dadas por la solución del *buffer* E (pH: 9,0 – $[MgCl_2]$: 1,5 mM) permitían la amplificación de ambos subtipos arrojando los mayores valores de DO, aunque con mayor eficiencia para el subtipo B [DO 2,201 (B) vs 0,905 (F)].

Tabla 10. Optimización de la amplificación con los cebadores ALL.

[MgCl ₂] mM		1,5	2,0	2,5	3,0	1,5	2,0	2,5	3,0
pH		8,5				9,0			
Solución Buffer		A	B	C	D	E	F	G	H
DO	HIV-B	N (0,172)	N (0,079)	P (0,376)	P (0,363)	P (2,201)	P (0,542)	P (0,709)	P (0,399)
	HIV-F	P (0,566)	P (0,500)	P (0,896)	P (0,332)	P (0,905)	P (1,317)	P (0,674)	P (1,699)

[MgCl ₂] mM		1,5	2,0	2,5	3,0	1,5	2,0	2,5	3,0
pH		9,5				10,0			
Solución Buffer		I	J	K	L	M	N	O	P
DO	HIV-B	P (1,197)	P (0,525)	P (0,240)	P (0,591)	P (1,092)	P (0,352)	N (0,163)	P (0,225)
	HIV-F	P (0,928)	P (0,430)	P (0,958)	P (1,793)	P (0,381)	P (1,444)	N (0,163)	P (0,671)

Una vez definidas la concentración de MgCl₂ y la composición salina para la amplificación, procedimos a determinar la T_H óptima para la sonda S-Gagp24. Para ello se analizó una muestra de PBMC derivado de un individuo HIV-positivo de subtipo B como CP, en las condiciones de amplificación descriptas previamente, utilizando el *buffer* E como solución *buffer* 10x y el perfil térmico antes detallado. Posteriormente, se ensayaron cuatro T_H (45°C, 50°C, 55°C y 65°C) en la etapa de hibridación líquida a la sonda S-Gagp24, seguida de detección colorimétrica. Los resultados obtenidos (Tabla 11) indicaron que la T_H= 55°C era la óptima para la sonda S-Gagp24 ya que a esa temperatura se obtuvo el máximo valor de DO en el CP.

En base al conjunto de experimentos realizados se obtuvieron las condiciones óptimas para la amplificación de secuencias de HIV-1 con los cebadores ALL, así como el protocolo de hibridación líquida a la sonda S-Gagp24 y de detección colorimétrica, los cuales se detallan en el Ítems 3.6.3.1 y 3.6.3.3.

Tabla 11. Determinación de la T_H óptima de la sonda S-Gagp24.

T _H	VC	CN	CP
45°C	0,118	N (0,065)	P (1,127)
50°C	0,104	N (0,100)	P (1,115)
55°C	0,110	N (0,101)	P (1,304)
65°C	0,122	N (0,110)	P (0,878)

4.1.3.2 CONDICIONES DE AMPLIFICACIÓN CON LOS CEBADORES SUD.

El sistema de cebadores SUD comparte con los cebadores ALL el mismo número de bases y de posición en la región *gag* del genoma del HIV-1, pero fueron diseñados sin la introducción de bases degeneradas en sus secuencias. Esto permitiría mayor versatilidad en el ajuste de las condiciones de amplificación y, por lo tanto, mayor factibilidad para incrementar la sensibilidad clínica de ensayo en el diagnóstico de la infección por HIV-1 en individuos de la región.

Teniendo en cuenta que los cebadores SUD comparten la región amplificada por los ALL, en la optimización de la amplificación del par SUD se ensayaron las concentraciones de $MgCl_2$ que arrojaron el mayor producto amplificado para ambos subtipos con los cebadores ALL (Tabla 10). Se definió una nueva condición de ciclado para los cebadores SUD: desnaturalización inicial (5 min a 95°C) seguida de 5 ciclos de amplificación (15" a 95°C, 15" a 55°C y 15" a 72°C), 40 ciclos de amplificación (15" a 95°C, 15" a 50°C y 15" a 72°C) y síntesis final de 5 min a 72°C. La mezcla de reacción se preparó con la solución *buffer* 1X provista con la Taq ADN polimerasa (Tris-HCl 1 mM pH 8,8; KCl 5 mM) y de pH cercano al del *buffer* E definido previamente (Tabla 10), 0,6 μ M de cada cebador (SUD-F1 y SUD-R1), 400 μ M de dNTPs, 2,5 U de ADN Taq Polimerasa, en presencia de 1,5 mM o 2,0 mM de $MgCl_2$, 5.000 copias de cada plásmido de referencia como molde y H_2O csp 50 μ l. Los productos amplificados obtenidos se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa, e hibridación líquida con la sonda S-Gagp24 a la T_H de 55°C definida previamente (Tabla 11), y detección colorimétrica. La intensidad de las bandas obtenidas luego de la electroforesis en gel de agarosa sugiere que los cebadores SUD tienen mayor eficiencia para amplificar al subtipo F que al B en las condiciones ensayadas (Figura 14A). No obstante, la concentración de $MgCl_2$ de 2,0 mM sería la más adecuada para la amplificación de ambos subtipos, ya sea solos o en forma combinada (Figura 14B).

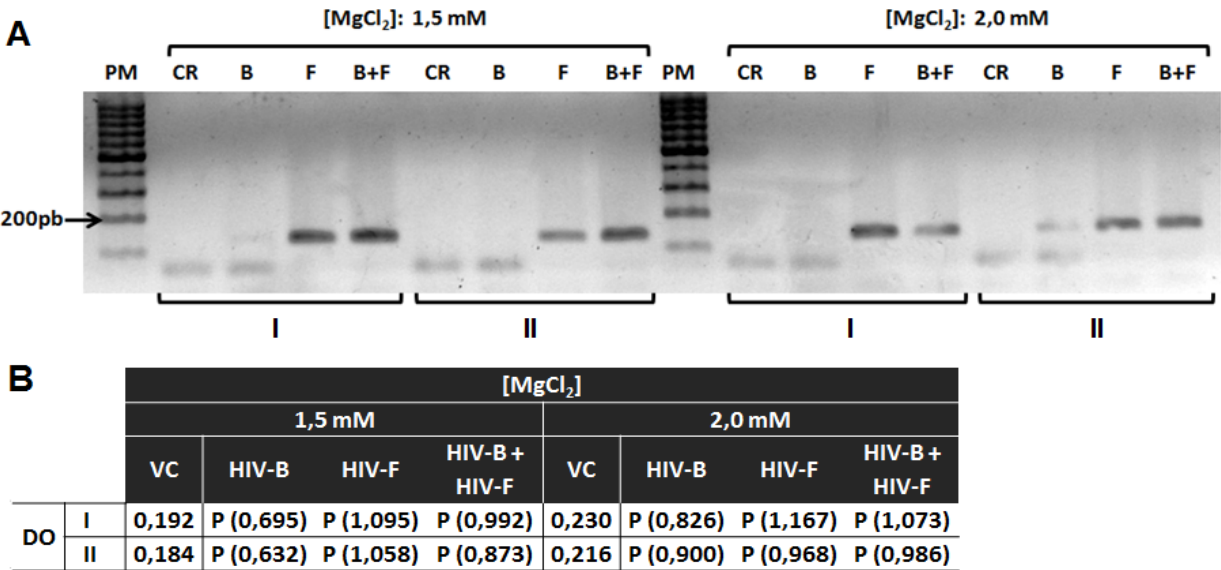
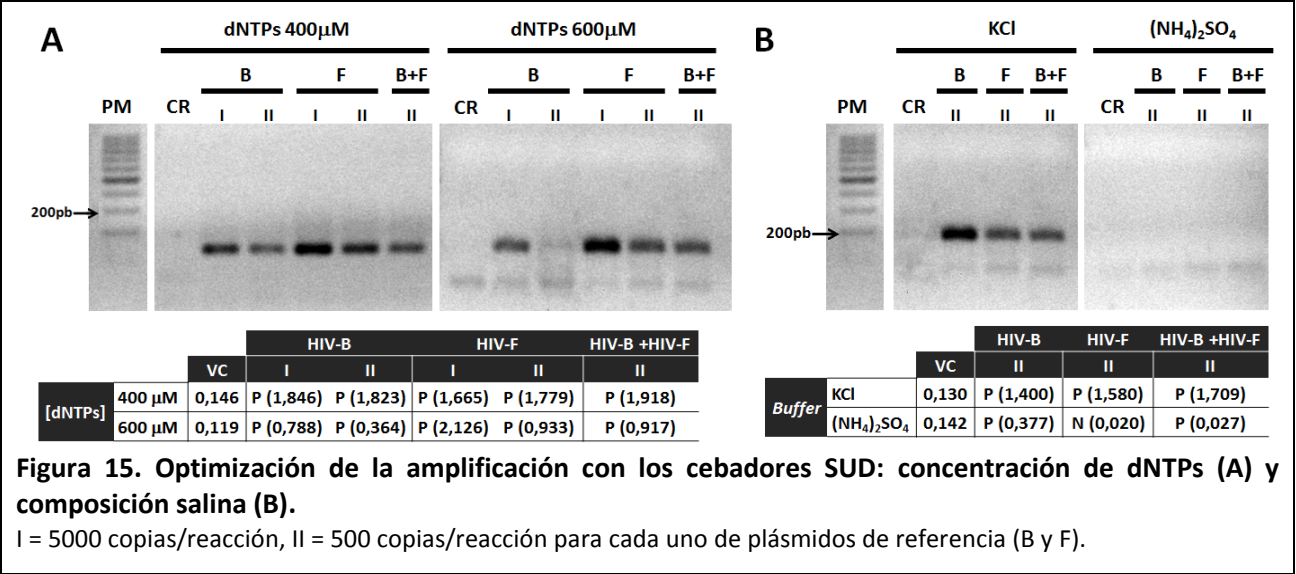


Figura 14. Optimización de la amplificación con los cebadores SUD: concentración de $MgCl_2$.
A. Electroforesis en gel de agarosa. **B.** Detección colorimétrica con la sonda genérica S-Gagp24.
Cada condición se ensayó en dos experimentos independientes (I y II).

Posteriormente, se procedió a determinar la concentración óptima de dNTPs, manteniendo fijos los otros parámetros de la reacción y trabajando con la concentración de $MgCl_2$ previamente definida (2,0 mM). Para ello se amplificaron 5.000 y 500 copias de cada plásmido de referencia por duplicado con 2 concentraciones de dNTPs: 400 μ M y 600 μ M. Los productos amplificados en cada condición se

analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa, e hibridación líquida y detección colorimétrica. Los resultados obtenidos (Figura 15A) muestran que 400 µM es la concentración óptima de dNTPs, ya que en esa condición se obtienen bandas más intensas y valores de DO más elevados para ambos subtipos, ya sea solos o en forma combinada, que utilizando 600 µM de dNTPs.



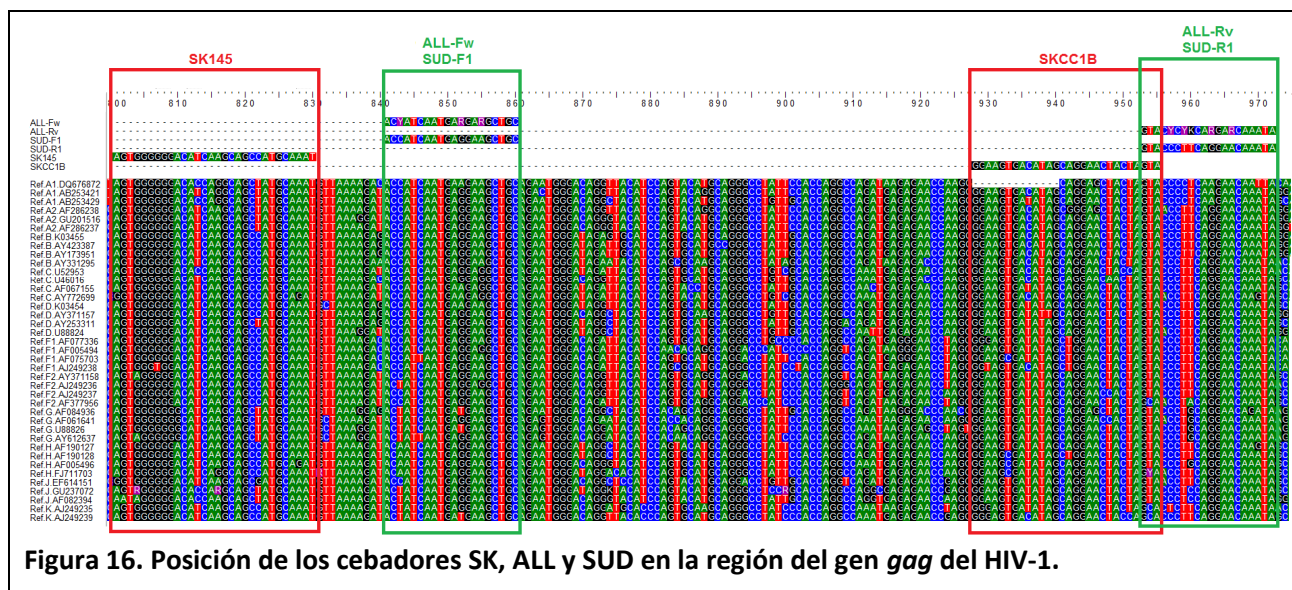
Finalmente se determinó la composición y concentración óptima del buffer de la reacción de PCR. Para ello se utilizaron soluciones tampón con composición salina provista por KCl o por (NH₄)₂SO₄ para amplificar 500 copias de cada plásmido de referencia. Los resultados obtenidos en la electroforesis en gel de agarosa y en la detección colorimétrica (Figura 15B) indican que la solución *buffer* compuesta por KCl sería la adecuada para la amplificación con los cebadores SUD.

En base al conjunto de experimentos realizados se obtuvieron las condiciones óptimas para la amplificación de secuencias de HIV-1 con los cebadores SUD, las cuales se detallan en el ítem 3.6.3.1.

4.1.4 SELECCIÓN DE UN SISTEMA DE REFERENCIA: CEBADORES SK.

Si bien el objetivo de este trabajo fue el desarrollo de una metodología para la detección de HIV-1, era necesario comparar los resultados obtenidos con el nuevo sistema de detección viral con un ensayo de referencia. Con ese objetivo, seleccionamos como ensayo de referencia el par de cebadores SK (SK145/SKCC1B) incluidos en el ensayo COBAS® AMPLICOR HIV-1 MONITOR Test v1.5 desarrollado por Roche Diagnostic Corporation. Este ensayo es usado ampliamente en nuestro país por diversos laboratorios bioquímicos y los cebadores SK145 y SKCC1B, que denominaremos de aquí en adelante “SK”, son capaces de detectar todos los subtipos del HIV-1, según las indicaciones del fabricante. Los cebadores SK (Anexo 3) amplifican un fragmento de 155 pb del gen gag [1359 → 1513 nt referida a la cepa HXB2] que puede ser detectado colorimétricamente por medio de la sonda SK102 (Anexo 3), también incluida en el ensayo COBAS® AMPLICOR HIV-1 MONITOR Test v1.5, con el mismo procedimiento que el utilizado para los ensayos en desarrollo. Además, los cebadores SK amplifican una región del gen gag del HIV-1

que se solapa con el fragmento amplificado por los cebadores ALL/SUD (Figura 16), característica que permite comparar el desempeño de cada sistema de cebadores y sondas entre sí.



Si bien las condiciones de amplificación de los cebadores SK fueron previamente descritas [157], fue necesario verificar cuáles eran las adecuadas para el equipamiento y los reactivos disponibles en nuestro laboratorio. En primer lugar, se probaron diferentes perfiles térmicos de amplificación (SK1, SK2 y SK3) en un volumen final de 50 μ l y en condiciones de reacción de solución *buffer* 1X (Tris-HCl 10 mM pH 8,8; KCl 50 mM), 1,5 mM de $MgCl_2$, 400 μ M de dNTP, 0,15 μ M de cada cebador SK145 y SKCC1B, y 2,5 U de ADN Taq Polimerasa. En todos los experimentos se utilizaron como molde 500 copias de cada plásmido de referencia en forma pura y combinada (cantidades equimolares de cada plásmido). Los productos amplificados obtenidos con los distintos perfiles térmicos se analizaron mediante detección colorimétrica utilizando la sonda SK102 a una T_H de 55°C. Los resultados obtenidos (Tabla 12) indicaron que el perfil SK3 arrojó los mayores valores de DO para ambos subtipos y por lo tanto se seleccionó como la condición de ciclado más adecuada para la amplificación con los cebadores SK.

Tabla 12. Optimización de los perfiles térmicos para la amplificación con los cebadores SK.

	Programa de amplificación	VC	HIV-B	HIV-F	HIV-B + HIV-F
SK1	5 min a 95°C + 5 ciclos (10" a 95°C, 10" a 60°C y 10" a 72°C) + 30 ciclos (10" a 95°C, 10" a 55°C y 10" a 72°C) + 5 min a 72°C.	0,160	P (0,509)	P (0,532)	P (0,549)
DO SK2	5 min a 95°C + 35 ciclos (10" a 95°C, 10" a 55°C y 10" a 72°C) + 5' a 72°C.	0,192	P (0,860)	P (1,272)	P (1,381)
SK3	5 min a 95°C + 45 ciclos (10" a 95°C, 10" a 55°C, y 10" a 72°C) + 5 min a 72°C.	0,204	P (1,658)	P (1,736)	P (2,287)

Posteriormente, se ensayaron 3 concentraciones de $MgCl_2$ (1,5 mM, 2,0 mM y 2,5 mM) utilizando el perfil térmico SK3. Los resultados expresados en la Tabla 13 indican que la concentración de 2,0 mM de

MgCl₂ arrojó los mayores valores de DO para los subtipos B y F y, por lo tanto, fue la más adecuada para el ensayo.

Tabla 13. Optimización de las concentraciones de MgCl₂ para el sistema PCR-SK.

		VC	[MgCl ₂]		
			1,5 mM	2,0 mM	2,5 mM
DO	HIV-B	0,154	P (3,316)	P (3,000)	P (3,319)
	HIV-F		P (2,746)	P (3,305)	P (3,289)
	HIV-B + HIV-F		P (2,011)	P (2,530)	P (1,717)

En base al conjunto de experimentos realizados se obtuvieron las condiciones óptimas para la amplificación de secuencias de HIV-1 con los cebadores SK (sistema de referencia), las cuales se detallan en el ítem 3.6.3.1.

4.1.5 ANÁLISIS DE DESEMPEÑO DE LOS CEBADORES EN EVALUACIÓN RESPECTO A LOS DE REFERENCIA EN LA DETECCIÓN DE CEPAS DE HIV-1 CIRCULANTES EN LA REGIÓN.

Una vez definidas las condiciones de reacción y perfiles de amplificación para cada par de cebadores en evaluación (ALL y SUD) y de referencia (SK) procedimos a comparar el desempeño de cada uno en detección de distintas cantidades de controles plasmídicos. Para ello se prepararon diluciones de los plásmidos de referencia para los subtipos B y F, puros y en forma combinada, y se analizaron mediante PCR, hibridación líquida con las sondas correspondientes y detección colorimétrica en las condiciones de reacción optimizadas previamente. Los resultados obtenidos (Tabla 14) muestran que todos los cebadores en estudio fueron capaces de detectar hasta 50 copias de los plásmidos conteniendo los subtipos B y F, ya sea en forma pura que combinada. Sin embargo, el sistema de cebadores SUD mostró mayor eficiencia en la detección de genomas plasmídicos respecto a los cebadores ALL y SK lo cual se evidencia por los mayores valores de DO obtenidos en todas las diluciones analizadas.

Tabla 14. Desempeño de los distintos cebadores en la detección de plásmidos de referencia regionales.

	Cebadores	VC	HIV-B (copias/reacción)			HIV-F (copias/reacción)			HIV-B + HIV-F (copias/reacción)		
			5000	500	50	5000	500	50	5000	500	50
DO	SK	0,250	P (1,194)	P (1,084)	P (0,568)	P (3,289)	P (1,729)	P (0,337)	P (2,993)	P (2,159)	P (0,336)
	ALL	0,292	P (2,491)	P (0,544)	P (0,329)	P (2,199)	P (1,461)	P (1,133)	P (2,419)	P (1,716)	P (2,484)
	SUD	0,302	P (2,830)	P (3,104)	P (2,973)	P (3,343)	P (2,667)	P (2,257)	P (2,942)	P (3,077)	P (3,120)

Posteriormente, procedimos a evaluar el desempeño de los 3 sistemas de cebadores para la detección molecular del HIV-1 en muestras clínicas. Para ello, se analizaron 8 muestras de PBMC de la colección disponible en el laboratorio derivadas de 5 individuos HIV-positivos (HIV+) y de 3 HIV-negativos (HIV-) residentes en la provincia de Santa Fe mediante PCR, hibridación líquida con las sondas

correspondientes y detección colorimétrica en las condiciones de reacción optimizadas previamente. Los resultados obtenidos de este experimento (Tabla 15) indican que: *i)* los cebadores SUD tuvieron una concordancia del 100% (8/8) con el diagnóstico de la infección por HIV-1 en las muestras analizadas de individuos de la región. *ii)* los cebadores SK mostraron una concordancia del 87.5% (7/8) con el diagnóstico de la infección por HIV-1 en las muestras analizadas, arrojando un resultado falsamente negativo (muestra W107), *iii)* los cebadores ALL mostraron la menor concordancia (62,5%; 5/8) con el diagnóstico de la infección por HIV-1, arrojando 3 resultados falsamente negativos (muestras W83, W105, W107), y *iv)* no se observaron amplificaciones inespecíficas en ninguno de los 3 sistemas.

Tabla 15. Desempeño de los distintos cebadores en la detección de ADN proviral en muestras clínicas.

	Cebadores	VC	HIV (-) W96	HIV (-) W97	HIV (-) W138	HIV (+) W83	HIV (+) W105	HIV (+) W107	HIV (+) W116	HIV (+) W122
DO	SK	0,140	N (0,042)	N (0,113)	N (0,062)	P (1,237)	P (0,377)	N (0,123)	P (3,299)	P (3,304)
	ALL	0,128	N (0,111)	N (0,097)	N (0,086)	N (0,108)	N (0,072)	N (0,069)	P (0,194)	P (0,147)
	SUD	0,310	N (0,058)	N (0,118)	N (0,288)	P (0,909)	P (1,561)	P (0,702)	P (2,079)	P (1,001)

En base a estos resultados, podemos concluir que los cebadores SUD fueron más eficientes que los cebadores de referencia SK y que los ALL en la detección de cepas circulantes de HIV-1 en la región. En base a estos hallazgos, se seleccionó el sistema de cebadores SUD para el desarrollo del ensayo de tamizaje molecular de la infección por HIV-1 propuesto en este trabajo de tesis y, por lo tanto, para la construcción del CIC, actividades que se detallan a continuación.

4.1.6 ESTRATEGIA GENERAL PARA LA CONSTRUCCIÓN Y PRODUCCIÓN DE CICs.

En el Laboratorio se dispone del genoma del bacteriófago Q β salvaje (Q β _{WT}) clonado como ADNc bajo el control del promotor T7 en un vector de expresión derivado de pBR322 (denominado pBRT7Q β _{WT}) con resistencia a Amp, que fue cedido gentilmente por el Dr. Hans Weber (Universidad de Zurich, Suiza).

A partir del mapa de expresión del genoma de Q β _{WT} (Figura 12) se seleccionó la zona correspondiente al extremo 5' de la proteína A1 para introducir las secuencias heterólogas correspondientes a los cebadores seleccionados para detectar al virus *target*. La elección de la región a modificar en el genoma de Q β se basó en las siguientes consideraciones: *i)* es la única región del genoma fágico que presenta sitios de restricción únicos (*Bst98I* y *NsiI*) separados por aproximadamente 200 pb, y *ii)* se ha utilizado anteriormente para introducir modificaciones nucleotídicas con alteraciones mínimas en la formación y ensamblado de partículas fágicas [148, 152, 153] (Ítem 1.10.3) y para la construcción de un CIC específico para la detección del ARN de HCV (CIC_{HCV}) realizado en nuestro laboratorio [154].

La estrategia general que se utilizó para desarrollar el CIC_{HCV} [154] implica, en primer lugar, el diseño de megacebadores de 50 pb conteniendo: *i)* los sitios de restricción de las enzimas *Bst98I* o *NsiI* útiles para el clonado, *ii)* las secuencias que hibridarán a los cebadores heterólogos para la detección del virus *target* (cebadores KY78 and KY80 para HCV [156]), y *iii)* secuencias fágicas de Q β _{WT} que permitan la hibridación al genoma fágico salvaje. Estos oligonucleótidos se utilizaron para producir un fragmento quimera de la región A1 (A1_{quimera}) por PCR a baja astringencia utilizando el vector pBRT7Q β _{WT} como molde (Figura 17A). El fragmento A1_{quimera} fue sucesivamente clonado en el vector pGEM®-T-Easy para su conservación como pA1_{quimera}. Posteriormente, el plásmido pA1_{quimera} fue digerido con las enzimas de restricción *Bst98I* y *NsiI* para liberar el inserto y el fragmento A1_{quimera} resultante fue clonado en pBRT7Q β _{WT} previamente cortado con el mismo par de enzimas (Figura 17B). De esta manera se obtuvo el ADNc del genoma fágico modificado bajo el control transcripcional del promotor T7, pBRT7Q β _{quimera}.

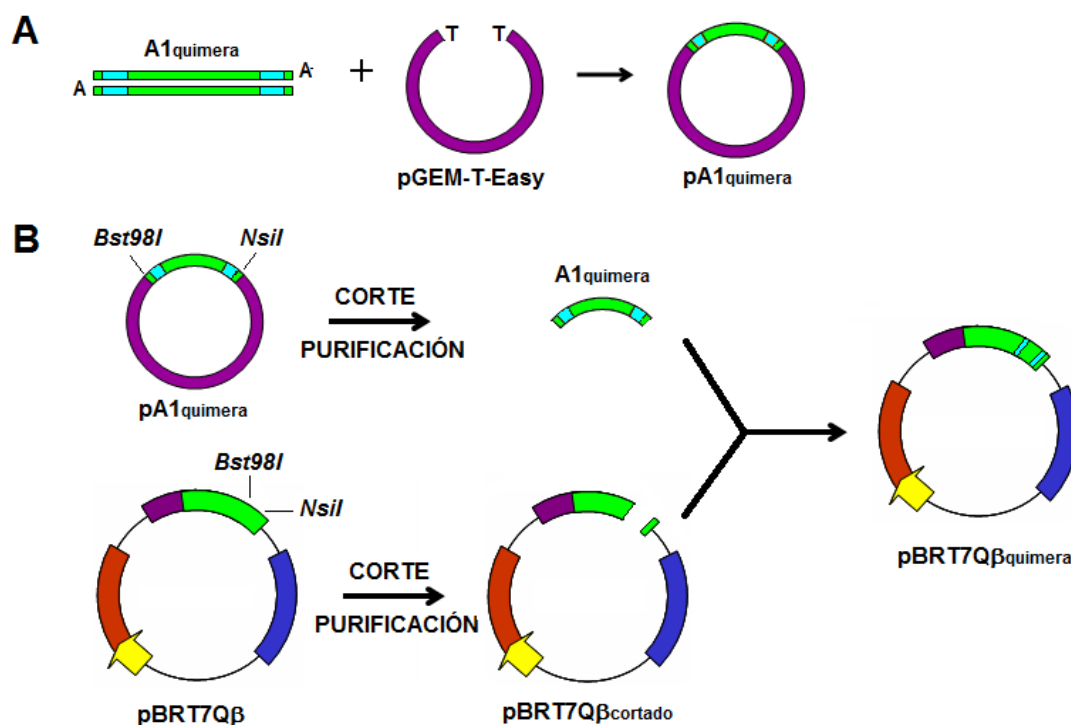


Figura 17. Estrategia de construcción del plásmido pBRT7Q β _{quimera}.

A. Clonado del fragmento A1_{quimera} en el vector pGEM®-T-Easy. **B.** Corte y clonado del fragmento A1_{quimera} en el plásmido pBRT7Q β _{WT} cortado con las enzimas de restricción *Bst98I* y *NsiI*.

Se muestran las secuencias fágicas de Q β _{WT} (verde) y los cebadores heterólogos para detectar el virus *target* (celeste).

Posteriormente, el pBRT7Q β _{quimera} se utilizó para transformar bacterias *E. coli* BL21 pLys S/DE3. Esta cepa es lisógena para el fago DE3, un derivado del fago λ que tiene la región de inmunidad del fago p21 y lleva un fragmento de ADN con una copia del gen *lacI* y una copia del gen que codifica para la ARN Polimerasa del bacteriófago T7 (T7-Pol) bajo el control del promotor *lacUV5*. Este fragmento está insertado en el gen *int* del fago λ , previniendo que DE3 se inserte o se escinda del genoma sin un fago auxiliar. En esta cepa, el único promotor conocido que dirige la síntesis de la T7-Pol es el *lacUV5*,

inducible por IPTG. Por lo que la adición de IPTG a un cultivo en crecimiento induce la síntesis de la T7-Pol que transcribe el ADN clonado bajo el control de T7 en el plásmido de expresión. Esta cepa contiene además un plásmido compatible que provee una pequeña cantidad de T7-Lisozima (Lz), la cual se une a la T7-Pol inhibiendo la transcripción, sin inhibir el crecimiento bacteriano. Los bajos niveles de Lz provistos por pLys S generalmente tienen poco efecto sobre la expresión de los genes clonados luego de la inducción de la T7-Pol por IPTG. La cantidad de enzima producida luego de la inducción no llega a ser inhibida por la cantidad de Lz sintetizada. De esta manera, la presencia del plásmido pLys S aumenta la tolerancia de la bacteria a plásmidos que expresan productos tóxicos asegurando además una regulación más eficiente en la expresión del genoma de Q β clonado (pBRT7Q β _{quimera}) (Figura 18).

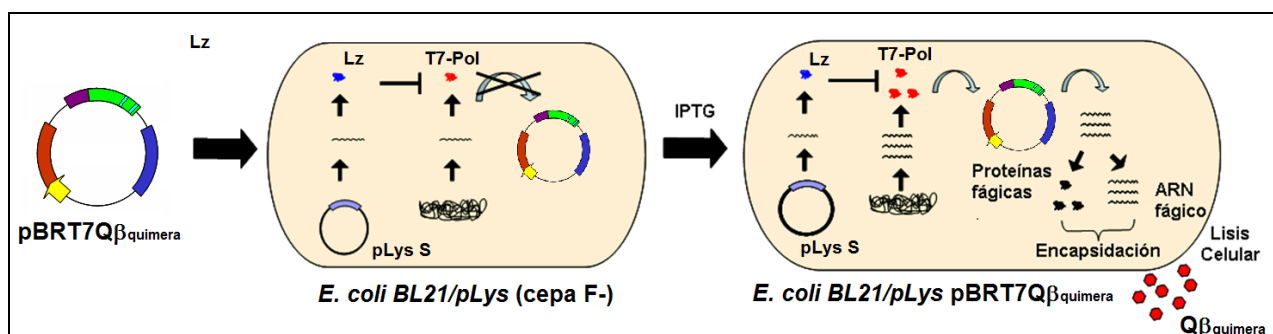


Figura 18. Sistema para la expresión de pBRT7Q β _{quimera} y producción de fagos Q β _{quimera}.

Previo al agregado de IPTG, la T7-Lisozima (Lz) sintetizada a partir del plásmido pLys S inhibe la escasa cantidad de T7-Pol que se sintetiza, por lo que no hay producción de transcritos a partir del promotor T7. Luego del agregado de IPTG aumentan los niveles de T7-Pol por lo que la Lz disponible no llega a inhibir a la T7-Pol y se produce la expresión de los genes de Q β _{quimera} a partir del promotor T7. Parte de estos transcritos son utilizados como ARN mensajeros para la síntesis de proteínas fágicas. Otros son utilizados como ARN genómicos y son encapsulados, se genera la progenie viral y la lisis celular.

Posteriormente, los fagos recombinantes (Q β _{quimera}) se ensayan en experimentos de infección utilizando la cepa aceptora *E. coli* XL1-Blue (F') para demostrar su funcionalidad y viabilidad. Los fagos Q β _{quimera} obtenidos contienen el ARN del fago Q β modificado por las secuencias de los cebadores heterólogos y está empaquetado en cápsides fágicas. Por lo tanto, el Q β _{quimera} puede ser utilizado como CIC en un sistema de amplificación basado en RT-PCR para la detección del virus de interés.

4.1.7 CONSTRUCCIÓN DE CICs PARA LA DETECCIÓN DEL ARN DE HIV-1.

4.1.7.1 GENERACIÓN DEL FRAGMENTO QUIMERA PARA CADA SISTEMA DE CEBADORES.

Como mencionado previamente (Ítem 1.10.3), la selección de la región genómica del fago Q β _{WT} para incorporar las secuencias heterólogas es fundamental para que no se afecten regiones esenciales en el ciclo replicativo del fago que codifican para proteínas de función vital o secuencias reguladoras. Por otro lado, la región a ser modificada de Q β _{WT} (Figura 12, nt 2.332 → 2.351) comprende la zona cercana al codón *stop* de la proteína A1 y del codón de inicio para la replicasa. Esta región estaría involucrada en la formación de estructuras secundarias que participan en la síntesis de ambas proteínas, por lo que una

modificación en su secuencia podría comprometer la regulación de la replicasa [151]. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, es la única región dentro del genoma de Q β _{WT} que presenta sitios de restricción únicos y separados por aproximadamente 200 pb. De esta forma, las secuencias heterólogas delimitarán fragmentos de longitudes similares en los CICs y en el virus *target* con los cebadores correspondientes (cebadores SUD: 132 pb; cebadores SK: 145 pb) y, por lo tanto, tendrán eficiencias similares en la co-amplificación.

En base a la estrategia general planteada previamente, se diseñaron los oligonucleótidos de 50 pb correspondientes para construir los CICs específicos para el ensayo de detección del ARN del HIV-1 en desarrollo (CIC_{SUD}) y para el ensayo de referencia (CIC_{SK}). En la Figura 19A se muestra la secuencia de la región codificante para la proteína A1 de Q β _{WT} previamente al reemplazo de las secuencias fágicas por las secuencias heterólogas. Los megacebadores diseñados, detallados en la Figura 19B, se denominaron A1-Bst98_{SUD}/A1-Nsi_{SUD} y A1-Bst98_{SK}/A1-Nsi_{SK} que incluyen las secuencias heterólogas que hibridarán a los cebadores seleccionados para el ensayo en desarrollo (RT-PCR/SUD) y de referencia (RT-PCR/SK), respectivamente.



Figura 19. Región de Q β _{WT} y megacebadores diseñados para cada sistema de cebadores de HIV-1.

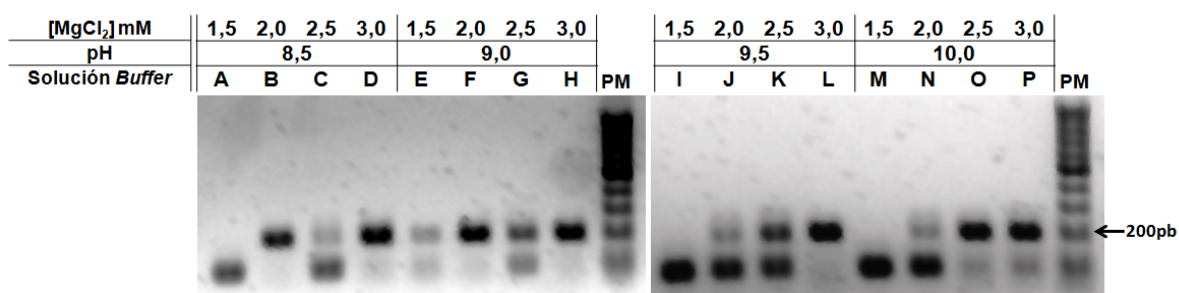
A. Región A1/Replicasa de Q β _{WT}. Secuencias nucleotídicas codificantes para la proteína A1 (verde), la replicasa (anaranjado) y la región intergénica no codificante ente ambas (negro) del fago Q β _{WT}. Se muestran los sitios de restricción únicos *Bst98I* (subrayado en rojo) y *NsiI* (subrayado en violeta), y la zona a ser reemplazada por las secuencias heterólogas del HIV-1 (subrayado en azul).

B. Megacebadores diseñados para construir los CICs específicos para los sistemas RT-PCR/SUD y RT-PCR/SK. Se marcan los sitios de restricción *Bst98I* (subrayado en rojo) y *NsiI* (subrayado en violeta), las secuencias heterólogas de HIV-1 para cada par de cebadores (rojo) y las secuencias fágicas (verde: proteína A1, anaranjado: replicasa, negro: región intergénica no codificante)

4.1.7.2 AMPLIFICACIÓN Y CLONADO DE LOS FRAGMENTOS QUIMERA (pA1_{SUD} y pA1_{SK}).

Cada par de megacebadores, A1-Bst98_{SUD}/A1-Nsi_{SUD} y A1-Bst98_{SK}/A1-Nsi_{SK}, fue utilizado para amplificar por PCR los fragmentos quimera A1_{SUD} o A1_{SK}, respectivamente, usando como molde el plásmido pBRT7Qβ_{WT} en reacciones independientes. Para ello se variaron las condiciones de pH y concentración de MgCl₂ a fin de encontrar las condiciones óptimas de reacción, como fue descrito previamente (Ítem 3.6.2). Los productos amplificados de 203 pb (A1_{SUD} y A1_{SK}) obtenidos con cada par de megacebadores (A1-Bst98_{SUD}/A1-Nsi_{SUD} o A1-Bst98_{SK}/A1-Nsi_{SK}, respectivamente) fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa y tinción con bromuro de etidio (Figura 20).

A MEGACEBADORES A1-Bst98_{SUD}/A1-Nsi_{SUD}



B MEGACEBADORES A1-Bst98_{SK}/A1-Nsi_{SK}

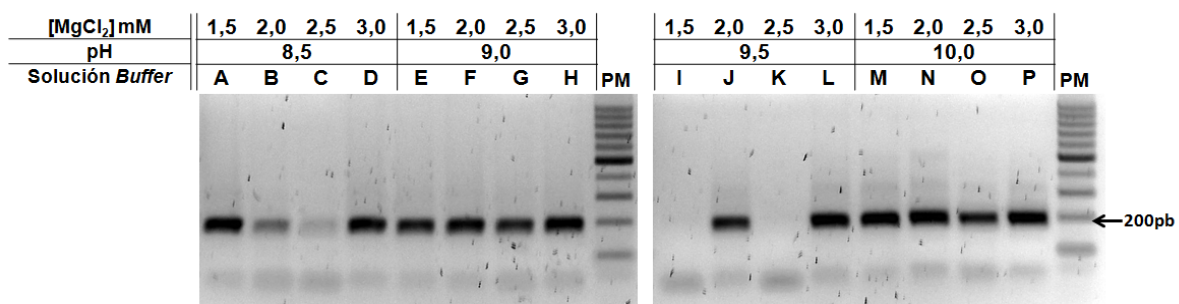
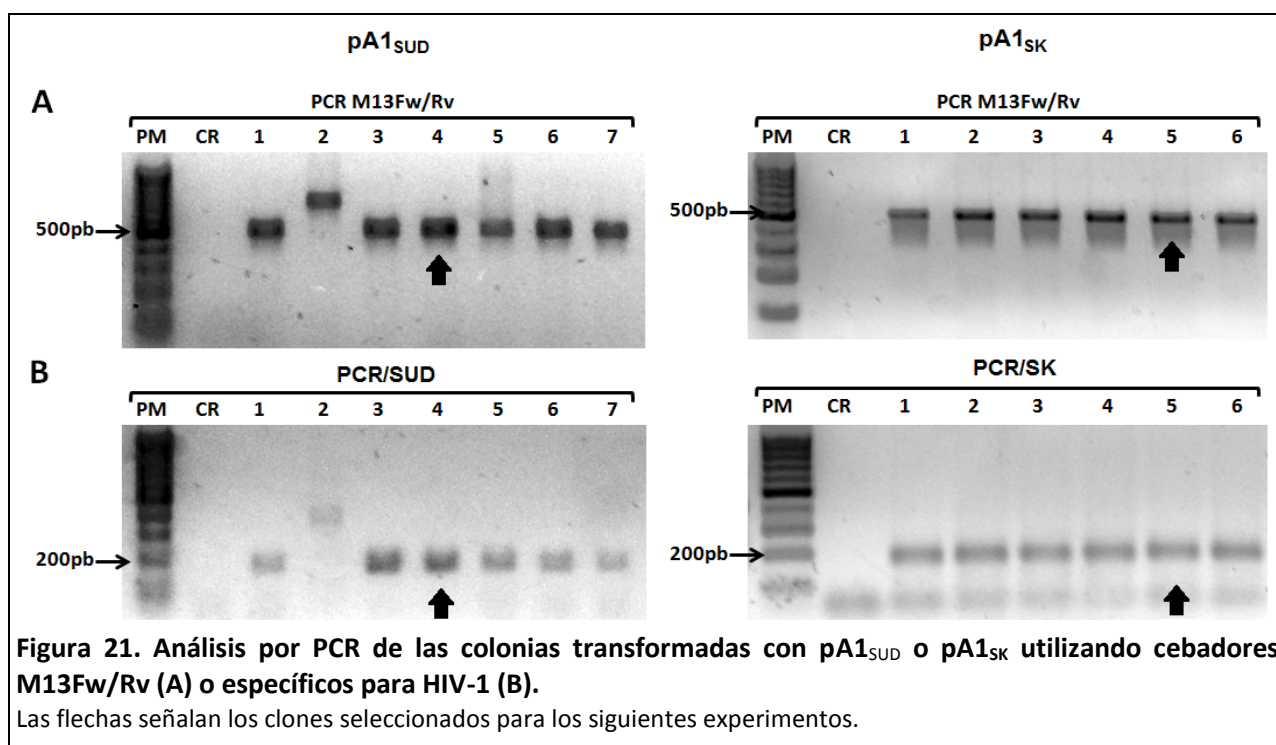


Figura 20. Determinación de las condiciones óptimas para la amplificación con los megacebadores A1-Bst98_{SUD}/A1-Nsi_{SUD} (A) y A1-Bst98_{SK}/A1-Nsi_{SK} (B).

Como puede visualizarse por la intensidad de las bandas resultantes de la amplificación con los cebadores A1-Bst98_{SUD}/A1-Nsi_{SUD}, el mayor rendimiento se obtuvo en las condiciones de pH y MgCl₂ provistas por las soluciones de *buffer* B, D, F, H, L, O y P (Figura 20A). Por otro lado, la amplificación con los cebadores A1-Bst98_{SK}/A1-Nsi_{SK} tuvo lugar en la mayoría de las condiciones ensayadas, obteniéndose el mayor rendimiento en las condiciones dadas por las soluciones de *buffer* A, D, E, F, G, H, J, L, M, N, O y P (Figura 20B).

Los fragmentos A1_{SUD} y A1_{SK} obtenidos en las condiciones dadas por el *buffer* D para ambos sistemas de cebadores fueron clonados de forma independiente en el vector pGEM®-T-*Easy*. Con el producto de cada ligación, pA1_{SUD} o pA1_{SK} respectivamente, se transformaron E.coli DH5α mediante electroporación y se seleccionaron colonias blancas y azules en medio LB-agar conteniendo Amp, IPTG y X-Gal. Se

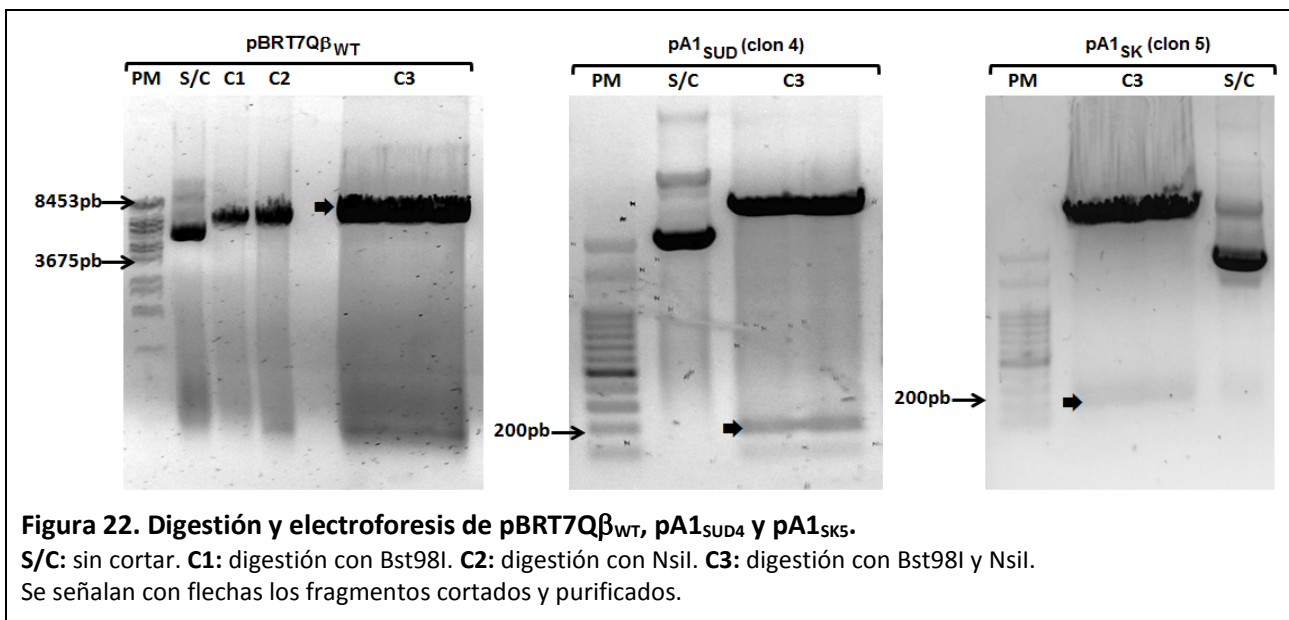
analizaron las colonias blancas obtenidas en cada transformación por PCR de colonia (Ítem 3.6.1) usando los cebadores M13-Fw y M13-Rv que hibridan en el plásmido pGEM®-T-Easy por fuera del sitio de clonado. Así, luego de la reacción de ligado, los plásmidos sin inserto con este par de cebadores dan un producto de amplificación de aproximadamente 250 pb mientras que los que sí presentan inserto generan un producto de 453 bp (203 pb del inserto A1_{SUD} o A1_{SK} + 250 pb). Los productos de PCR de colonia se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa y tinción con bromuro de etidio. Los resultados indicaron que la mayoría de las colonias blancas analizadas contenían pA1_{SUD} o pA1_{SK}, como puede observarse por la presencia de bandas de aproximadamente 450 pb en ambas construcciones (Figura 21A). Para verificar que los insertos incluyeran las secuencias heterólogas correspondientes reemplazadas en el genoma fágico, las mismas colonias seleccionadas previamente fueron analizadas con los cebadores específicos respectivos mediante PCR, electroforesis en gel de agarosa y tinción con bromuro de etidio. Los resultados obtenidos confirmaron que las colonias previamente analizadas contenían los insertos de interés, como puede evidenciarse por las bandas del tamaño esperado (203 pb) en ambas construcciones (Figura 21B).



Se seleccionaron los clones 4 y 5 de pA1_{SUD} y pA1_{SK}, respectivamente, y cada uno fue digerido con las enzimas de restricción *Bst98I* y *NsiI* para liberar los insertos. Los productos de digestión se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa y tinción con bromuro de etidio. Las bandas de 203 pb, correspondientes a los fragmentos quimera A1_{SUD} o A1_{SK}, fueron purificados a partir del gel de agarosa (Figura 22). En paralelo, el vector pBRT7Qβ_{WT} fue sometido al mismo procedimiento y se purificó el fragmento de aproximadamente 7.200 pb a partir del gel de agarosa. Posteriormente, el fragmento de

7.200 pb obtenido fue nuevamente digerido con enzimas de restricción y purificado para minimizar la presencia de vector no cortado.

Finalmente, se procedió al clonado de los fragmentos A1_{SUD} o A1_{SK} en el fragmento de 7.200 pb obtenido a partir del vector pBRT7Qβ_{WT} cortado, siguiendo la estrategia planteada (Figura 17B). De esta manera se obtuvieron los ADNc del genoma del fago modificado bajo el control transcripcional del promotor T7, pBRT7Qβ_{SUD4} y pBRT7Qβ_{SK5}. Ambos se utilizaron para transformar bacterias *E.coli* DH5α de forma independiente con el fin de poder amplificarlos.



4.1.7.3 EVALUACIÓN DE LOS CONSTRUCTOS pBRT7Qβ_{SUD4} Y pBRT7Qβ_{SK5}.

Para poder verificar la correcta sustitución de las regiones fágicas por los secuencias heterólogas correspondientes a los cebadores SUD-F1/SUD-R1 o SK145/SKCC1B, se desarrolló el ensayo PCR-Qβ_{A1}. Dicho ensayo incluye los cebadores Qb-S y Qb-AntiS (Anexo 3), específicos para la región A1 de Qβ_{WT}, y por lo tanto, no deberían amplificar a los vectores pBRT7Qβ_{SUD4} y pBRT7Qβ_{SK5} si las construcciones fueran correctas (Figura 18, región marcada en azul). Además se diseñó la sonda S-Qb (Anexo 3) para poder detectar de forma específica los productos amplificados obtenidos, mediante hibridación líquida y revelado colorimétrico. Las condiciones óptimas del ensayo PCR-Qβ_{A1} se definieron utilizando el plásmido pBRT7Qβ_{WT} como molde y se describen en el Ítem 3.6.2.

Sucesivamente, se evaluaron los constructos pBRT7Qβ_{SUD4} y pBRT7Qβ_{SK5} con los ensayos PCR-Qβ_{A1}, PCR/SUD (Ítem 3.6.3.1) y PCR/SK (Ítem 3.6.3.1). Si las construcciones fueran correctas no deberían obtenerse productos amplificados con los cebadores Qb-S y Qb-AntiS por el reemplazo con las secuencias heterólogas correspondientes. Los resultados de este experimento muestran que los constructos pBRT7Qβ_{SUD} y pBRT7Qβ_{SK} solo se amplifican con los cebadores correspondientes (Figura 23), no existiendo producto cuando se ensayan con el sistema PCR-Qβ_{A1}, tanto luego de electroforesis en gel de

agarosa (Figura 23A) como por detección colorimétrica con las sondas específicas correspondientes (Figura 23B). Los resultados obtenidos indicaron que los clones seleccionados (pBRT7Qβ_{SUD4} y pBRT7Qβ_{SK5}) contenían los fragmentos quiméricos correspondientes y que ninguno estaba contaminado con el vector salvaje pBRT7Qβ_{WT}.

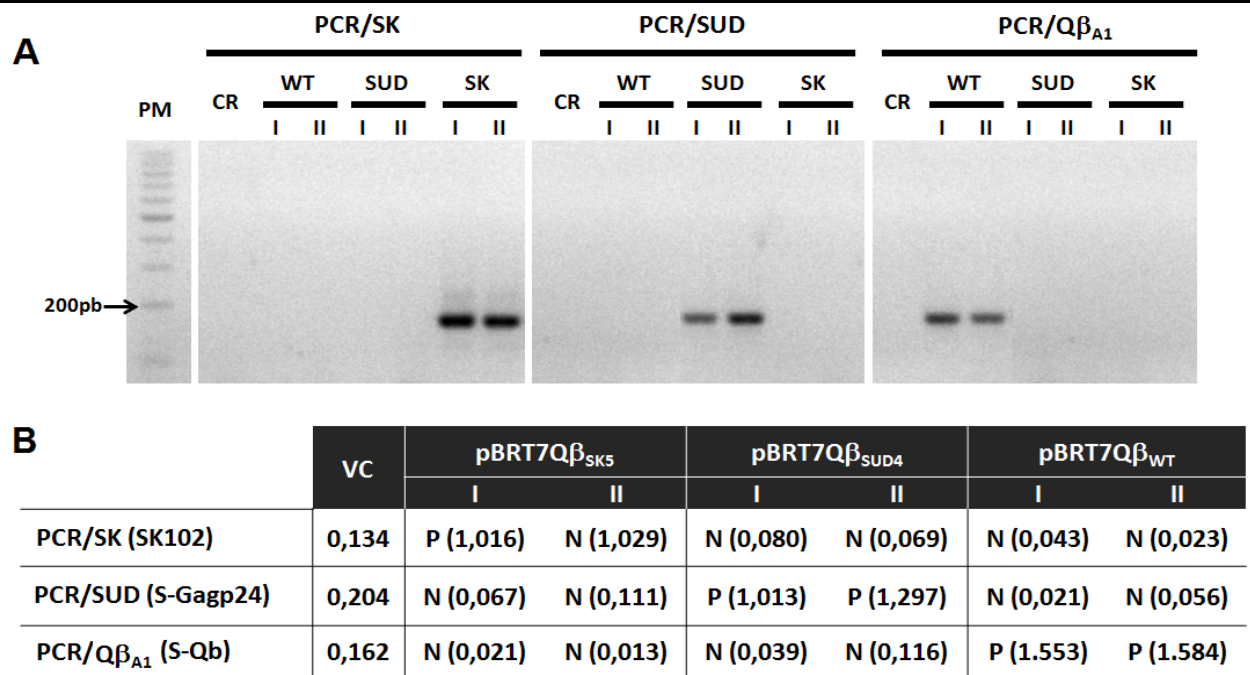


Figura 23. Análisis de los constructos pBRT7Qβ_{SK5} y pBRT7Qβ_{SUD4}.
A. Gel de agarosa. B. Detección colorimétrica. Se detalla cada método de amplificación utilizado con la sonda correspondiente. Cada constructo se ensayó por duplicado (I y II).
WT: pBRT7Qβ_{WT}. SK: pBRT7Qβ_{SK5}. SUD: pBRT7Qβ_{SUD4}.

Posteriormente, los vectores pBRT7Qβ_{SUD4} y pBRT7Qβ_{SK5} fueron digeridos con *Bst98 I* y *Nsi I* con el fin de corroborar que se liberasen los fragmentos A1_{SUD} o A1_{SK} de 203 pb, respectivamente (Figura 24).

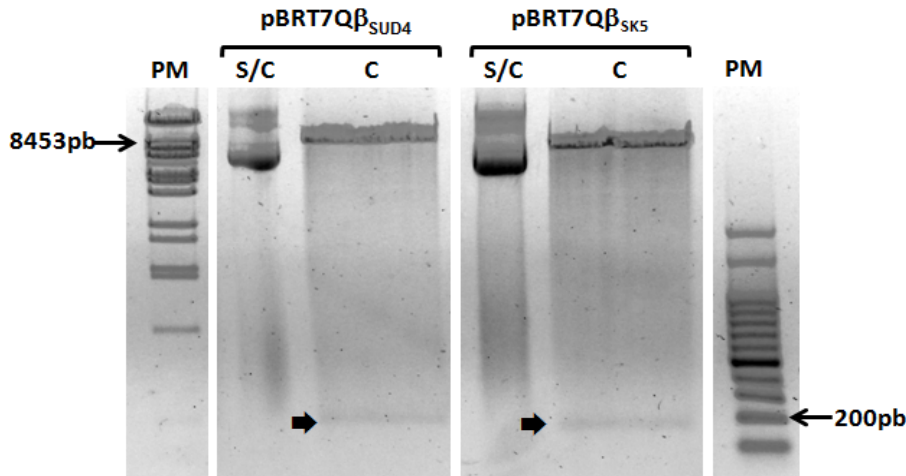


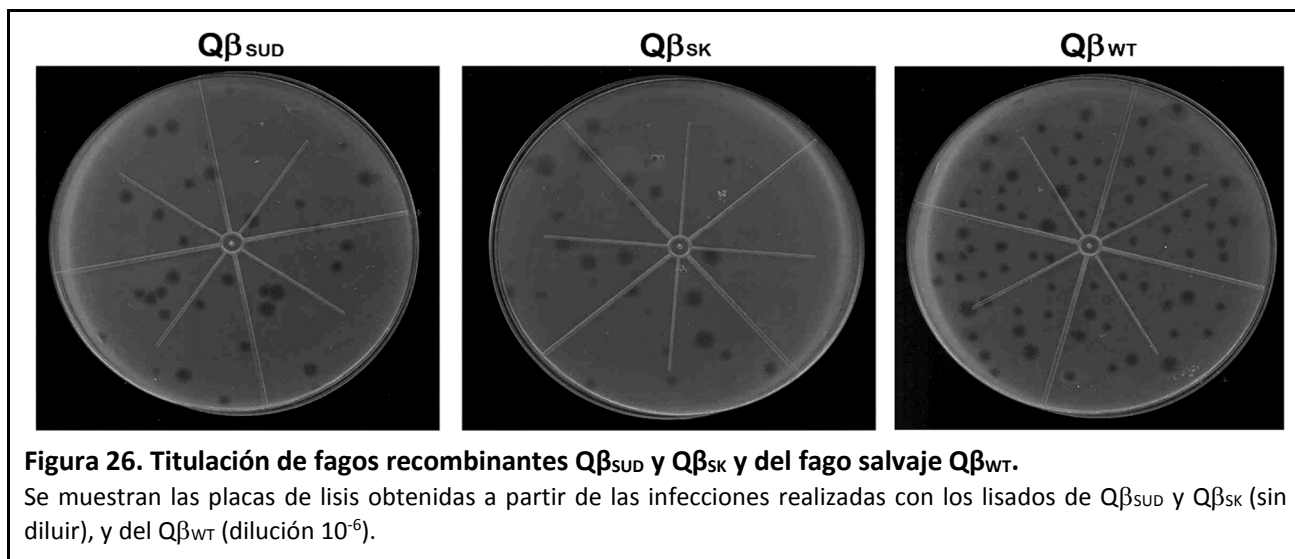
Figura 24. Digestión con *Bst98 I* y *Nsi I* y electroforesis de los constructos pBRT7Qβ_{SUD4} y pBRT7Qβ_{SK5}.
S/C: sin cortar. C: tratado con *Bst98 I* y *Nsi I*. Se marcan con flechas los fragmentos de 203 pb liberados.

Finalmente, los vectores pBRT7Q β _{SK5} y pBRT7Q β _{SUD4} fueron cuantificados por medida de absorbancia a 260 nm y se enviaron al servicio de secuenciación de la Universidad de Maine (EE.UU.). Las secuencias obtenidas se muestran en la Figura 25 donde se comparan con las secuencias de las cepas de referencia. Los resultados obtenidos indican que ambas construcciones fueron correctas.

En base al conjunto de experimentos realizados podemos confirmar que los constructos pBRT7Q β _{SUD4} y pBRT7Q β _{SK5} contienen las secuencias heterólogas introducidas y correspondientes a los cebadores SUD y SK, por lo que pueden ser utilizados para la producción de los CIC_{SUD} y CIC_{SK}, respectivamente.

4.1.8 ANÁLISIS DE LA PRODUCCIÓN E INFECTIVIDAD DE LOS FAGOS RECOMBINANTES Q β _{SUD} Y Q β _{SK}.

Con los constructos pBRT7Q β _{SUD4} y pBRT7Q β _{SK5} obtenidos se procedió a transformar cepas de *E. coli* BL21(DE3)/pLysS mediante tratamiento térmico a fin de producir los fagos recombinantes correspondientes Q β _{SUD} y Q β _{SK} como fue descrito (Ítem 3.5.1), y a evaluar posteriormente la infectividad de los lisados fágicos obtenidos (Ítem 3.5.2). Los resultados de este experimento muestran que se obtuvo una baja producción de placas de lisis a partir de los fagos recombinantes en relación al fago salvaje (Figura 26). Además, dado que sólo se obtuvieron placas de lisis cuando se utilizaron los lisados sin diluir, no fue posible obtener títulos estadísticamente significativos para Q β _{SUD} o Q β _{SK}.



Con el objetivo de optimizar el sistema de producción de fagos de manera de obtener resultados reproducibles y significativos se variaron las condiciones en las que se realizaba la infección. Algunas de las modificaciones respecto a las condiciones iniciales del ensayo fueron: *i*) aumentar la concentración final de IPTG de 1 mM a 5 mM para la reforzar la inducción, *ii*) incrementar el tiempo de incubación del lisado con la cepa *E. coli* XL1BlueF' de 30 a 60 minutos para favorecer la infección, y *iii*) agregar 100 μ l de lisado en lugar de 10 μ l para aumentar el número de fagos disponibles para la infección. En ninguna de las condiciones ensayadas se obtuvieron placas de lisis (datos no mostrados). Por lo tanto, concluimos

A	pBRT7QB _{WT}	T A A G T C G A T A A A T G C T T A T T G C T C T C T T A G C G A T A T T G C G G C C T A T C A C G C C G A T G G C G T G A T A G T T G G C T T T T G C G C G A T C C A T C C A G T G G T →
	Qb-S A T A A A T G C T T A T T G C T C T
	Qb-Antis
	S-Qb A T A G T T G G C T T T T G G C G C
	pBRT7QB _{SUD4}	T A A G T C G A C C C A T C A A T G A G G A A G C T G C T A G C G A T A T T G C G G C C T A T C A C G C C G A T G G C G T G A T A G T T G G C T T T T G C G C G A T C C A T C C A G T G G T →
	SUD-F1 A C C A T C A A T G A G G A A G C T G C
	SUD-R1 A G T G G G G G G A C A T C A A G C A G C C A T G C T A A T
	pBRT7QB _{SK65}	A A G T C G A G T G G G G G G A C A T C A A G C A G C C A T G C T A A T G C G G C C T A T C A C G C C G A T G G C G T G A T A G T T G G C T T T T G C G C G A T C C A T C C A G T G G T G →
	SK145 A G T G G G G G G A C A T C A A G C A G C C A T G C T A A T
	SKCC1B
	pBRT7QB _{WT}	→ G G T G C C A T A C C G T T T G A C T T C A C T A A G T T T G A T A A G A C T A A A T G T C C T A T T C A A G C C G T G A T A G T C G T T C C T C G T G C T T A G T A A C T A A G G A T G A
	Qb-S
	Qb-Antis C G T G C T T A G T A A C T A A G G A T
	S-Qb
	pBRT7QB _{SUD4}	→ G G T G C C A T A C C G T T T G A C T T C A C T A A G T T T G A T A A G A C T A A A T G T C C T A T T C A A G C C G T G A T A G T C G T T C C T G T A C C C T T C A G G A C A C A A T A G A
SUD-F1	→	
SUD-R1	→ G T G C C A T A C C G T T T G A C T T C A C T A A G T T T G A T A A G A C T A A A T G T C C T A T T C A A G C C G T G A T A G G A A G T G A C A T A G C A G G A C T A C T A G T A G A A	
pBRT7QB _{SK65}	→ G T G C C A T A C C G T T T G A C T T C A C T A A G T T T G A T A A G A C T A A A T G T C C T A T T C A A G C C G T G A T A G G A A G T G A C A T A G C A G G A C T A C T A G T A G A A	
SK145	
SKCC1B G G A A G T G A C A T A G C A G G A C T A C T A G T A	
B	HXB2.K03455	T G C T A A A C A C A G T G G G G G G A C A T C A A G C A G C C A T G C A A A T G T T A A A A G A G A C C A T C A A T G A G G A A G C T G C A G A A T G G G A T A G A G T G C A T C C A G T →
	pNL4-3 (HIV-B)	T G C T A A A C A C A G T G G G G G G A C A T C A A G C A G C C A T G C A A A T G T T A A A A G A G A C C A T C A A T G A G G A A G C T G C A G A A T G G G A T T G A T T C C A C →
	p93BR020.1 (HIV-1)	T G T T A A A T A C A G T G G G G G G A C A T C A A G C A G C C A T G C A A A T G T T A A A A G A C A C C A T C A A T G A G G A G C T G C A G A A T G G G A C A G A A T T A C A T C C A C →
	SUD-F1 A C C A T C A A T G A G G A A G C T G C
	SUD-R1
	S-Gagp24
	SK145 A G T G G G G G G A C A T C A A G C A G C C A T G C T A A T
	SKCC1B
	SK102 G A G A C C A T C A A T G A G G A A G C T G C A G A A T G G G A T
	HXB2.K03455	→ G C A T G C A G G G C C T A T T G C A C C A G G C C A G A T G A G A G A A C C A A G G G G A A G T G A C A T A G C A G G A A C T A C T A G T A C C C T T C A G G A A C A A A T A G G A T G G →
	pNL4-3 (HIV-B)	→ G C A T G C A G G G C C T A T T G C A C C A G G C C A G A T G A G A G A A C C A A G G G G A A G T G A C A T A G C A G G A A C T A C T A G T A C C C T T C A G G A A C A A A T A G G A T G G →
	p93BR020.1 (HIV-1)	→ A C A G G C A G G A C C C A T C C C C C A G G T C A G A T A A G G G A A C C T A G G G G A A G T G A T A G C T G G A A C T A C T A G T A C C C T T C A G G A A C A A A T A C A A T G G →
	SUD-F1
	SUD-R1
	S-Gagp24
SK145 C C W A G G G A A G T G A Y A T A G C	
SKCC1B	
SK102 G G A A G T G A C A T A G C A G G A A C T A C T A G T A	

Figura 25. Análisis comparativo de las secuencias informadas correspondientes a:

- (A) constructos pBRT7Qb_{WT}, pBRT7Qb_{SUD4} y pBRT7Qb_{SK65} con los cebadores Qb, SUD y SK, y sonda S-Qb. El cebador utilizado para la secuenciación corresponde a una región corriente arriba de la secuencia mostrada (Qb-Fw: 5'-ATGCGACTTATCTTGCTACTGA-3'). Se resaltan las secuencias del fago salvaje (verde), los cebadores SUD (rojo), los cebadores SK (azul), las secuencias fágicas reemplazadas coincidente con los cebadores Qb y la sonda S-Qb (negro).
- (B) cepa del HIV-1 y plásmidos de referencia (HXB2 y pNL4-3/p93BR020.1, respectivamente) con los cebadores SUD y SK, y las sondas S-Gagp24 y SK102.

Se resaltan las coincidencias de los cebadores SK145 y SK102 con la sonda S-Qb (negro).

que las primeras condiciones ensayadas fueron las más adecuadas para la infección a pesar de que el título de fagos recombinantes fue muy bajo (1×10^2 UFP/ml para ambos) con respecto a la cepa salvaje (1×10^9 UFP/ml).

Para que las partículas fágicas $Q\beta_{SK}$ y $Q\beta_{SUD}$ puedan ser utilizadas como CICs en los ensayos de RT-PCR correspondientes, era necesario corroborar que solo contengan el ARN modificado encapsidado y libre del ADN plasmídico utilizado para la transformación ($pBRT7Q\beta_{SK5}$ o $pBRT7Q\beta_{SUD4}$) que pudiera interferir en la interpretación de los resultados. Para ello, se realizó un tratamiento con ADNasa a alícuotas de los lisados fágicos correspondientes, como se describió en el Ítem 3.5.4. A continuación, se extrajo el ARN de los lisados tratados con un método comercial y se analizaron mediante RT-PCR y detección colorimétrica, con los cebadores y sondas correspondientes, en presencia y ausencia de enzima MMLV-RT (Ítems 3.6.3.1 y 3.6.3.2). Los resultados obtenidos (Tabla 17, Tratamiento A) muestran que solo se observó amplificación en presencia de reacción de retrotranscripción. Por lo tanto, podemos concluir que los lisados obtenidos de $Q\beta_{SK}$ y $Q\beta_{SUD}$ contienen ARN recombinante amplificable sin ADN plasmídico contaminante.

Posteriormente, procedimos a determinar si los ARN recombinantes contenidos en $Q\beta_{SK}$ y $Q\beta_{SUD}$ estaban encapsidados en partículas fágicas o si se trataba de ARN libre, producto de la transcripción a partir del promotor T7 en las cepas transformadas por los constructos en evaluación, $pBRT7Q\beta_{SK}$ y $pBRT7Q\beta_{SUD}$. Con ese objetivo, alícuotas de cada lisado de fagos recombinantes fueron sometidas al tratamiento con ADNasa (Ítem 3.5.4) seguido por el método de ARNasa (Ítem 3.5.5), se extrajo el ARN con un método comercial y se procedió a la amplificación mediante RT-PCR y detección colorimétrica en presencia y ausencia de enzima MMLV-RT (Ítems 3.6.3.1 y 3.6.3.2). Según nuestra hipótesis, luego del tratamiento con ARNasa se esperaba que se amplificase únicamente el ARN protegido ya que el ARN libre sería degradado. Los resultados obtenidos (Tabla 17, Tratamiento B) indican que los ARN de los fagos recombinantes $Q\beta_{SK}$ y $Q\beta_{SUD}$ estaban encapsidados.

Tabla 17. Evaluación de la presencia de ARN modificado encapsidado y libre del ADN plasmídico en los lisados de $Q\beta_{SUD}$ y $Q\beta_{SK}$.

	VC	Lisado de $Q\beta_{SUD}$				VC	Lisado de $Q\beta_{SK}$			
		Ausencia de RT		Presencia de RT			Ausencia de RT		Presencia de RT	
		I	II	I	II		I	II	I	II
Tratamiento A	0,132	N (0,049)	N (0,036)	P (1,289)	P (1,619)	0,182	N (0,053)	N (0,106)	P (0,959)	P (0,947)
Tratamiento B	0,138	N (0,071)	N (0,053)	P (1,125)	P (1,395)	0,178	N (0,068)	N (0,107)	P (0,959)	P (0,919)

Los lisados de $Q\beta_{SUD}$ y $Q\beta_{SK}$ se ensayaron por duplicados (I y II), en presencia y ausencia de MMLV-RT.

Tratamiento A: ADNasa. Tratamiento B: ADNasa + ARNasa.

Disponer de genomas fágicos constituidos por ARN recombinante encapsidado en cápsides proteicas y, por lo tanto, protegido de la degradación de ARNasas, constituye uno de los requisitos fundamentales para su uso como CIC para detección de virus con genoma de ARN. En base al conjunto de resultados obtenidos podemos concluir que los fagos recombinantes $Q\beta_{SK}$ y $Q\beta_{SUD}$ presentan características similares al virus a detectar (HIV-1) para ser utilizados como controles de calidad de todo el proceso analítico correspondiente (extracción del ARN, RT-PCR y detección con los cebadores específicos y sondas correspondientes).

4.1.9 ANÁLISIS DE LA ESTABILIDAD DE LOS FAGOS RECOMBINANTES $Q\beta_{SK}$ Y $Q\beta_{SUD}$ A 4°C.

Una característica importante para que los fagos recombinantes con genoma de ARN puedan utilizarse como CIC en reacciones basadas en RT-PCR para el diagnóstico de rutina es que sean estables a 4°C para poder ser mantenidos en la heladera por largos periodos de tiempo. Por lo tanto, una vez verificada la presencia de ARN modificado encapsidado en los lisados obtenidos de $Q\beta_{SK}$ y $Q\beta_{SUD}$, procedimos a determinar la estabilidad a 4°C en el tiempo. Los tiempos ensayados fueron 0, 3, 4, 7 y 24 meses desde su producción. Para ello se extrajo el ARN por método de columna a partir de 150 μ l de los lisados conteniendo $Q\beta_{SK}$ o $Q\beta_{SUD}$ conservados a 4°C y se analizaron por RT-PCR y detección colorimétrica con los reactivos correspondientes (RT-PCR/SK o RT-PCR/SUD, respectivamente). Los resultados obtenidos (Figura 27) muestran que los valores de DO se mantuvieron estables para ambos fagos recombinantes en el período de tiempo analizado, lo que permite concluir que las suspensiones de $Q\beta_{SK}$ y $Q\beta_{SUD}$ en medio SM son estables por al menos 24 meses a 4°C sin perderse su viabilidad. Estos experimentos permitieron estimar el período de tiempo mínimo durante el cual $Q\beta_{SK}$ y $Q\beta_{SUD}$ pueden conservarse para su uso como CICs.

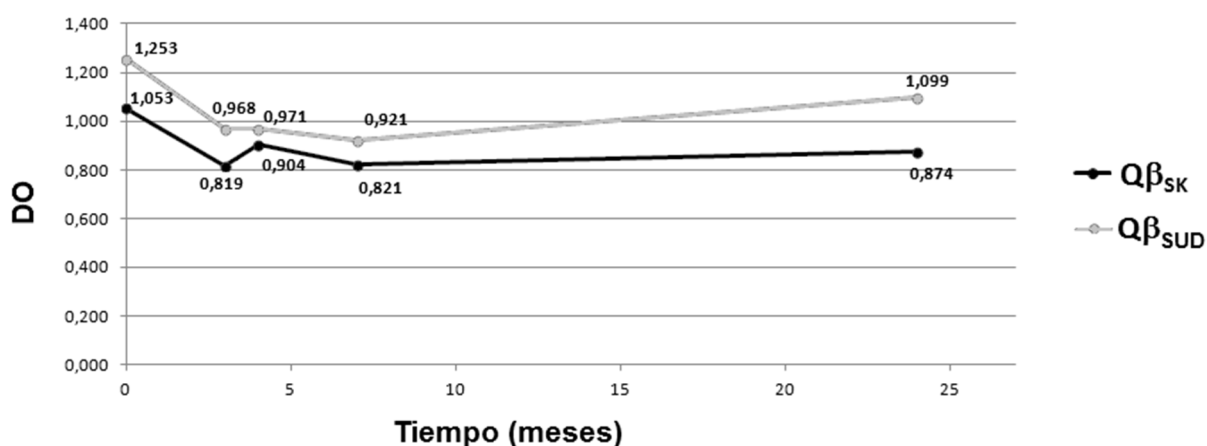


Figura 27. Estabilidad en el tiempo de las partículas fágicas $Q\beta_{SK}$ y $Q\beta_{SUD}$ a 4°C.

4.1.10 OPTIMIZACIÓN DEL SISTEMA DE PRODUCCIÓN DE FAGOS RECOMBINANTES.

Teniendo en cuenta los bajos títulos obtenidos con el procedimiento realizado para la obtención de fagos recombinantes (ítem 4.1.8) y con el objetivo de incrementar la producción de $Q\beta_{SK}$ y $Q\beta_{SUD}$ se realizó el procedimiento descrito por Yamamoto [163], el cual es considerado el método estándar para la purificación de bacteriófagos a partir de grandes volúmenes de solución. A diferencia del método utilizado anteriormente (Ítem 3.5.1), este procedimiento se basa en la precipitación de las partículas fágicas con polietilenglicol de masa molecular de 8000 Da (PEG-8000), y presenta las ventajas de realizarse a pH neutro, a altas concentraciones iónicas y en ausencia de otras sustancias orgánicas que puedan impactar sobre la viabilidad de los fagos recombinantes [180]. El PEG es un polímero sintético químicamente inerte, no tóxico y soluble en agua con dos posibles mecanismos de acción sobre las proteínas:

- exclusión estérica de las proteínas de la solución, lo cual provoca un aumento de su concentración hasta que se excede la solubilidad para producirse la precipitación. La formación del precipitado se verá afectada por el tamaño, la concentración, la carga y la fuerza iónica inicial de la proteína [181].
- dado que las cargas superficiales de la proteína producen un efecto termodinámico desfavorable sobre el PEG solubilizado, a altas concentraciones del polímero se produce la precipitación de las proteínas. Por ende, las proteínas con mayor densidad de carga precipitarán con mayor facilidad que las con menor densidad [182].

En base a estas consideraciones se procedió a evaluar si el tratamiento con el PEG-8000 favorecería la concentración de los fagos, y por lo tanto el título, de las partículas fágicas recombinantes respecto al método tradicional. Para ello, se realizó el procedimiento descrito en el Ítem 3.5.3, y los lisados obtenidos se conservaron a 4°C. Finalmente, se realizaron los ensayos de infección y titulación con la cepa *E. coli* XLBlueF' no obteniéndose placas de lisis para ninguno de los fagos recombinantes $Q\beta_{SK}$ y $Q\beta_{SUD}$.

En base a los resultados obtenidos luego del tratamiento con el PEG-8000, procedimos a estudiar la eficiencia de cada paso del método de Yamamoto mediante extracción de los ácidos nucleicos y amplificación con los sistemas RT-PCR/SK o RT-PCR/SUD en presencia y en ausencia de MMLV-RT para corroborar que: *i)* los fagos $Q\beta_{SK}$ y $Q\beta_{SUD}$ se estuvieran formando post-inducción con IPTG, *ii)* el paso de concentración con el PEG-8000 permitiera la recuperación de los fagos en el sedimento, y *iii)* se encontraran partículas fágicas en la fase acuosa previo a la ultracentrifugación. Los resultados obtenidos en este experimento se muestran en la Tabla 16 e indican que las partículas fágicas se formaban pero no eran precipitadas con el PEG-8000 perdiéndose en el sobrenadante (Muestra A), y por lo tanto, no se encontraban presentes en la fase acuosa luego del tratamiento con cloroformo para recuperar los fagos del sedimento (Muestra B).

Tabla 16. Evaluación en la eficiencia de recuperación de fagos con el método de Yamamoto [163].

	Lisado de Q β _{SUD}			Lisado de Q β _{SK}		
	VC	Muestra A	Muestra B	VC	Muestra A	Muestra B
Ausencia de RT	0,164	N (0,043)	N (0,040)	0,148	N (0,034)	N (0,026)
Presencia de RT	0,172	P (3,181)	N (0,032)	0,142	P (1,769)	N (0,030)

Muestra A: alícuota del sobrenadante a descartar luego del agregado de PEG-8000.
Muestra B: alícuota de la fase acuosa obtenida del tratamiento con cloroformo para recuperar los fagos del sedimento luego de la precipitación con PEG-8000.

4.1.11 ANÁLISIS ESTRUCTURAL DE LA PROTEÍNA A1 EN LOS FAGOS Q β _{SUD} Y Q β _{SK}.

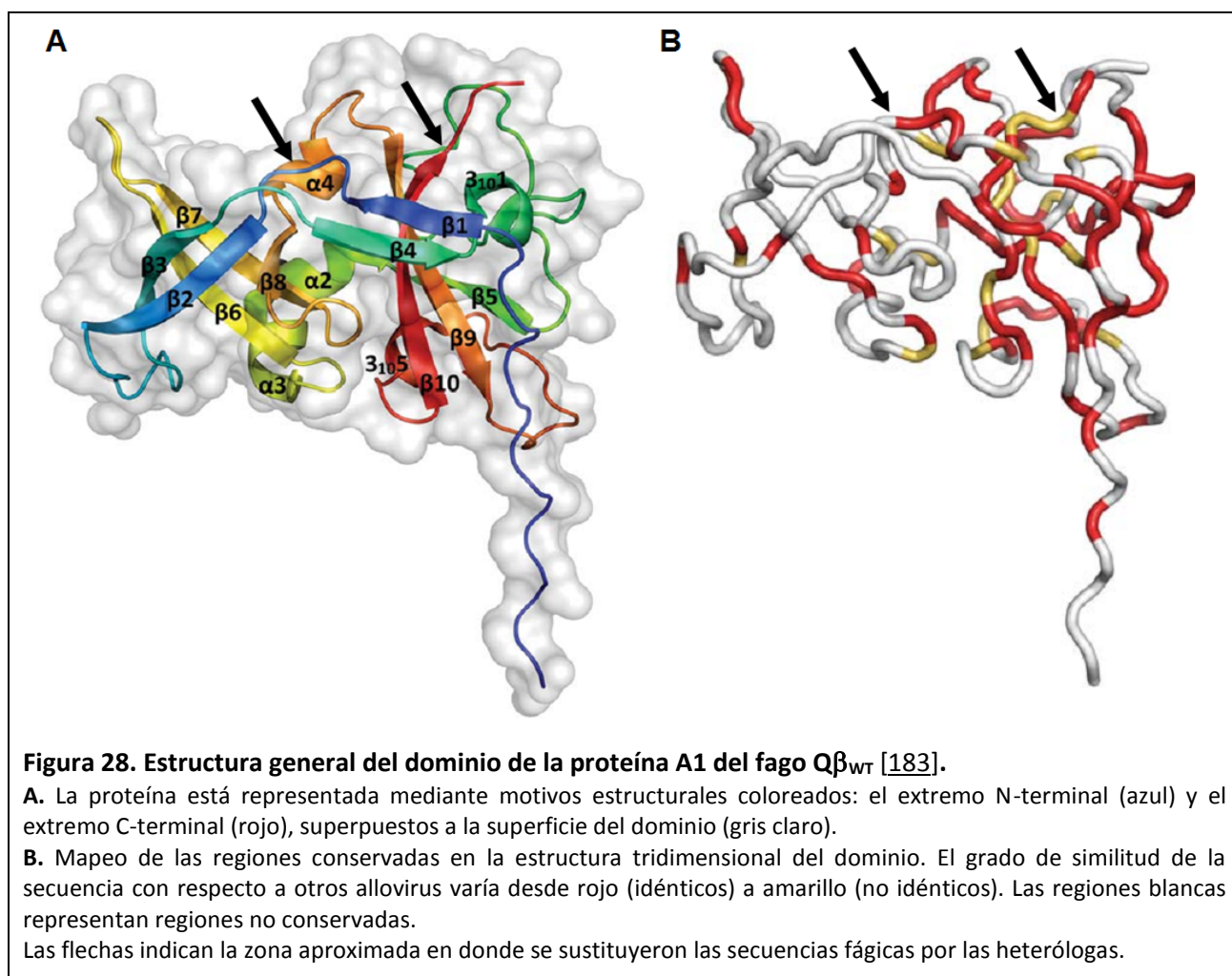
Dado que los fagos recombinantes Q β _{GAG} y Q β _{SK} no eran capaces de ser aglutinados por el PEG-8000, y teniendo en cuenta los bajos títulos obtenidos en relación al fago salvaje (Figura 26), procedimos a analizar si las modificaciones realizadas en las secuencias nucleotídicas para obtener Q β _{SUD} y Q β _{SK} afectaban las secuencias aminoacídicas y, por lo tanto, las estructuras secundarias y terciarias de las proteínas A1 recombinantes respectivas.

La estructura tridimensional del dominio de la proteína A1 del bacteriófago Q β _{WT} (Figura 28) ha sido reportada recientemente [183] y no presenta similitud con ninguna estructura publicada en el *Protein Data Bank* [184]. A excepción de la región N-terminal, el dominio globular tiene una forma compacta con una mezcla de arquitecturas α/β . El núcleo del dominio globular se construye a partir de 10 hojas- β (Figura 28A): i) 5 hojas- β (β 2, β 3, β 6, β 7 y β 8) forman una estructura de β -barril en un lado de la proteína, y ii) 5 hojas- β (β 1, β 4, β 5, β 9 y β 10) forman 2 hojas anti-paralelas en el lado opuesto. Además existen 3 α -hélices y 2 3_{10} -hélices en la proteína, de escasa longitud y de localización predominantemente superficial. Un bucle muy largo (23 residuos) conecta el primer 3_{10} -hélice con la hoja- β 5, mantenido espacialmente por enlaces de hidrógeno. Se observan 8 residuos de prolina que forman una hélice de poliprolina tipo II, particularmente larga, flexible en solución y que conecta dos subdominios de la enzima [183].

Cuando se comparan las secuencias de los allovirus disponibles, se observa que las proteínas de la cubierta son las más conservadas (~64% de identidad de secuencia), seguido de la replicasa (~44% de identidad) y de las proteínas de maduración (~29% de identidad). Con respecto a la proteína A1, la identidad total es de sólo el 26%, siendo la región más divergente de todas las proteínas la del fago Q β _{WT}. Sin embargo, en una alineación de secuencias de proteínas A1 de fagos representativos de Grupo III (Q β y MX1) se observan varias regiones conservadas (Figura 28B). En primer lugar, en la región N-terminal (residuos 146-159), aproximadamente el 50% de los residuos son prolinas en todos los allovirus, lo que sugiere que la hélice de poliprolina está presente en todas las proteínas A1 y es probablemente importante para su función. Un corto tramo de AA inmediatamente después de la hélice también se conserva. Las regiones conservadas más prominentes se encuentran en los residuos 207 al 219 y 228 al

238, que forman parte del largo bucle entre la 3_{10} -hélice y la hoja- $\beta 5$. La región C-terminal está relativamente conservada, encontrándose la mayoría de los residuos conservados cercanos a la hélice de poliprolina, lo que sugiere que esta parte del dominio es la más crítica para la funcionalidad de la proteína A1 [183].

La función real de la proteína A1 aún sigue siendo un enigma. Sin embargo, es esencial para la producción de partículas fágicas viables [185]. La inserción de 5 residuos de la región preS1 del HBV en la región C-terminal de la proteína A1 como epítipo de anticuerpos, demostró la localización superficial de esta proteína y permitió la obtención de fagos recombinantes viables [148]. Hoy se sabe que la inserción se realizó después del residuo 204, en la 3_{10} -hélice, que se localiza en la superficie de la proteína y es probable que no perturbe la estructura del dominio globular [183].



La introducción de los cebadores KY78 y KY80 en la secuencia del fago Q β_{WT} para la construcción del C1C_{HCV} (Q β_{HCV}) creó un codón *stop* en la posición 279 de la proteína A1, provocando la síntesis de una proteína de menor longitud (51 AA menos). En los ensayos de infectividad de Q β_{HCV} se obtuvieron títulos bajos (1×10^2 UFP/ml) respecto al Q β_{WT} (1×10^9 UFP/ml), demostrando que las partículas fágicas recombinantes presentaban deficiencias en su capacidad de infección respecto a las salvajes [154].

En este trabajo de tesis, los experimentos realizados con los fagos $Q\beta_{SUD}$ y $Q\beta_{SK}$ mostraron títulos similares (1×10^2 UFP/ml para ambos). Si bien el reemplazo de las secuencias fágicas por las heterólogas no redujo el tamaño de la proteína A1 de forma tan drástica como en el $Q\beta_{HCV}$ (Figura 29), sí se modificaron motivos estructurales en el extremo C-terminal que evidentemente afectaron la capacidad infectiva. Brevemente, para construir el $Q\beta_{SUD}$: i) se afectaron los AA A_{277} , L_{281} y I_{284} , ii) se perdieron los motivos estructurales hoja- $\beta 8$ y $\alpha 4$ -hélice, y iii) se reemplazó el codón de stop de la posición 330 por una F_{330} , alargando la proteína recombinante $A1_{SUD}$ en 6 AA. Por otro lado, para el $Q\beta_{SK}$: i) se afectaron los AA A_{277} , L_{281} , I_{284} , V_{325} , V_{326} y P_{327} , ii) se perdieron los motivos estructurales hoja- $\beta 8$, $\alpha 4$ -hélice y hoja- $\beta 10$, y iii) se introdujo un codón de stop en la posición 327 acortando en 3 AA a la proteína recombinante $A1_{SK}$.

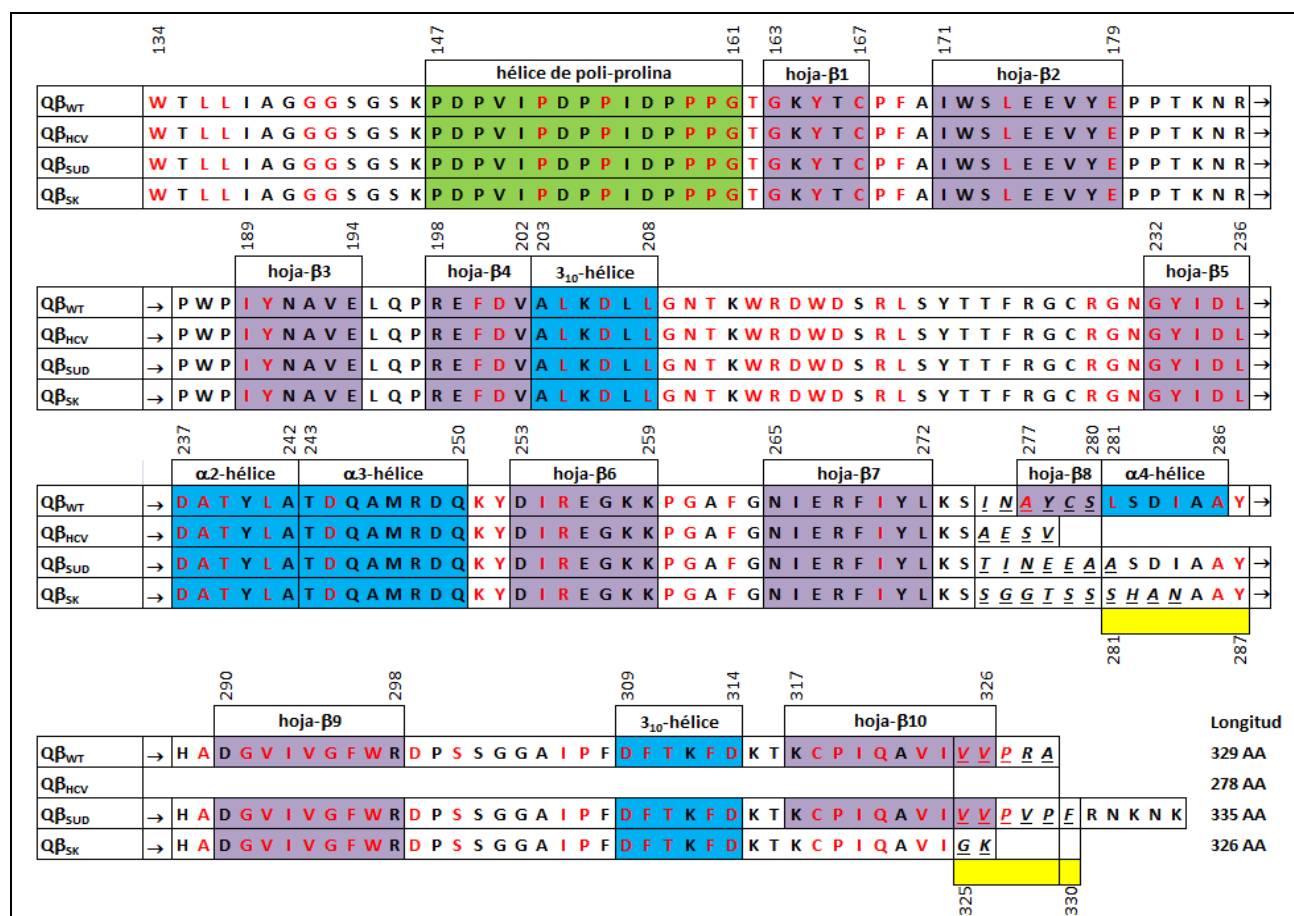


Figura 29. Comparación entre las secuencias de AA del dominio de la proteína A1 de $Q\beta_{WT}$ y de los fagos recombinantes $Q\beta_{HCV}$, $Q\beta_{SUD}$ y $Q\beta_{SK}$.

Los residuos conservados en todos los allovirus se muestran en rojo. Los números indican la posición de los elementos de estructura secundaria (verde: hélice de poli-prolina, violeta: hoja- β , azul: hélices) asignados para el fago salvaje. Las regiones modificadas por el reemplazo de las secuencias heterólogas se señalan en amarillo, mientras los residuos afectados se indican en itálica y subrayados.

Por lo expuesto, podemos inferir que las modificaciones realizadas en el extremo C-terminal de las proteínas A1 de los fagos $Q\beta_{SUD}$ y $Q\beta_{SK}$ pueden haber alterado el dominio funcional de la proteína, de forma que:

- afectarían la capacidad infectiva de las partículas fágicas recombinantes como se evidenció en los experimentos de titulación de $Q\beta_{SUD}$ y $Q\beta_{SK}$ (Ítem 4.1.8).
- producirían un cambio de la carga superficial de A1 por la incorporación de AA ácidos (R_{331} , K_{333} y K_{335} en $Q\beta_{SUD}$, y K_{326} en $Q\beta_{SK}$) o polares no cargados (N_{332} y N_{334} en $Q\beta_{SUD}$), afectando así la unión de las cápsides fágicas recombinantes con el PEG-8000 a través de enlaces electrostáticos.

No obstante, los fagos recombinantes $Q\beta_{SUD}$ y $Q\beta_{SK}$ fueron contruidos para ser utilizados como CICs en sistemas de detección del ARN de HIV-1 de elevada sensibilidad por lo que se requieren mínimas cantidades (10 - 50 copias/ml) para ser adicionados a la muestra de plasma previamente a la extracción de ARN (Figura 13). Por lo tanto, podemos concluir que las modificaciones realizadas en las secuencias de la proteína A1 salvaje para construir $Q\beta_{SUD}$ y $Q\beta_{SK}$ podrán disminuir sus capacidades infectivas y condicionar el proceso de purificación con el método basado en precipitación con el PEG-8000, pero no afectarán la función específica para la cual fueron contruidos en este trabajo de tesis.

4.1.12 IMPLEMENTACIÓN DE LOS FAGOS RECOMBINANTES COMO CICs.

Como se comentó en la Introducción (Ítem 1.9.3), muchos de los ensayos aplicables como NAT presentaban un espectro de especificidad limitado, destinado principalmente al subtipo B del HIV-1, ya que estas variantes eran las predominantes en EE.UU. y en Europa occidental cuando se desarrollaron [186]. El conocimiento creciente sobre la diversidad genética del HIV-1 y la necesidad de detectar la mayoría de las variantes virales dieron lugar a una serie de mejoras en el diseño de los ensayos. Para ello, la OMS desarrolló en 2001 el primer panel de referencia para ensayos moleculares que incluía virus de distintos subtipos del grupo M del HIV-1, y del grupo N y O, para ser utilizado en la optimización de herramientas para el diagnóstico y detección temprana del virus (www.nibsc.org/documents/ifu/01-466.pdf).

Antes de la incorporación como CIC_{SUD} en el ensayo RT-PCR/SUD, para la detección temprana del HIV-1, se procedió a verificar la capacidad del sistema en detectar las distintas variantes del virus. Para ello, utilizamos el “2nd WHO International Reference Panel Preparation for HIV-1 Subtypes for NAT (Main) - NIBSC code: 12/224” (www.nibsc.org/documents/ifu/12-224.pdf), disponible en el laboratorio. Se extrajo el ARN viral a partir 150 μ l de cada uno de los subtipos incluidos en el panel, se realizó la RT-PCR/SUD y se procedió a la detección colorimétrica con la sonda específica S-Gagp24. En todos los casos se utilizaron las condiciones previamente estandarizadas (Ítems 3.6.3.2 y 3.6.3.3). En la Tabla 18 se muestran los valores de DO para cada uno de los subtipos correspondientes al panel en estudio, e indica que el ensayo RT-PCR/SUD en evaluación fue capaz de detectar todos los subtipos del grupo M, así como las variantes del grupo N y grupo O.

Tabla 18. Evaluación del 2nd WHO International Reference Panel for HIV-1 Subtypes con el sistema RT-PCR/SUD.

	VC	Grupo M								Grupo N	Grupo O
		A	B	C	D	E	F	G	H		
DO	0,202	P (0,774)	P (0,687)	P (0,608)	P (0,340)	P (0,395)	P (0,887)	P (0,951)	P (0,617)	P (0,612)	P (0,273)

En base a estos resultados, y habiendo determinado la funcionalidad (Ítem 4.1.8) y la estabilidad en el tiempo (Ítem 4.1.9) de los fagos recombinantes Q β _{SUD} y Q β _{SK} desarrollados, se procedió a su incorporación como CIC_{SUD} y CIC_{SK} en los ensayos y RT-PCR/SUD y RT-PCR/SK, respectivamente. De esta manera se llegó al formato final de los ensayos en evaluación y de referencia, que denominaremos RT-PCR/SUD/CIC_{SUD} y RT-PCR/SK/CIC_{SK}, respectivamente, y por lo tanto se procedió a evaluar el desempeño de ambos ensayos en la detección de muestras previamente caracterizadas de individuos de la región. Con ese objetivo, se analizaron muestras de plasmas HIV+ de carga viral conocida (M1, M2, M3, M4 y M5) y de plasma negativo (M0), en presencia y en ausencia del CIC correspondiente. A 150 μ l de plasma se agregaron 150 μ l de la suspensión fágica (CIC_{SUD} o CIC_{SK}), se extrajo el ARN y se realizó la RT-PCR con los cebadores correspondientes. Posteriormente, se procedió a la detección colorimétrica con las sondas específicas S-Gagp24 (RT-PCR/SUD/CIC_{SUD}) o SK102 (RT-PCR/SK/CIC_{SK}) para el HIV-1 y la sonda S-Qb para ambos los CICs. En todos los casos se utilizaron las condiciones previamente estandarizadas (Ítems 3.6.3.2 y 3.6.3.3). Los resultados obtenidos (Tabla 19) en esta evaluación indican que el ensayo desarrollado en este trabajo doctoral (RT-PCR/SUD/CIC_{SUD}) tuvo un desempeño similar al ensayo de referencia (RT-PCR/SK/CIC_{SK}) en las muestras analizadas. Para ambos sistemas, la detección del HIV-1 en ausencia de competencia (sin CIC) presentó valores de DO de magnitudes similares a los obtenidos cuando la competencia existió (con CIC) debido a la co-amplificación simultánea de ambas secuencias *target* (HIV-1 y CIC). Por ejemplo, en el ensayo RT-PCR/SUD/CIC_{SUD} cuando se analiza la detección del virus *target* (S-Gagp24) para M3 en ausencia de CIC_{SUD} se obtuvo una DO de 2,236, mientras que cuando el CIC_{SUD} estaba presente se observó un valor de DO menor (1,895), aunque siempre fue positivo según el VC. Por otro lado, para M4 los valores de DO en ausencia y en presencia de CIC_{SUD} fueron similares (1,289 y 1,342, respectivamente). Resultados análogos se obtuvieron con el ensayo de referencia. Dado que el virus *target* (HIV-1) y el CIC compiten por los mismos cebadores en cada ensayo, la cantidad de CIC a agregar a cada muestra de plasma y las condiciones analíticas optimizadas son requisitos fundamentales para que en la reacción de RT-PCR esta competencia no vaya en detrimento de la detección de la infección de HIV-1. En ese sentido podemos concluir que las cantidades de CIC_{SUD} y de CIC_{SK} adicionadas a las muestras de plasma, tanto cuando éstas contienen CV altas (por ejemplo: M1) o bajas (por ejemplo: M2) fueron las adecuadas para las condiciones de reacción obtenidas. Sin embargo, sería conveniente poder concentrar

las partículas de $Q\beta_{SUD}$ y de $Q\beta_{SK}$ presentes en los lisados fágicos para poder agregar menores cantidades de los CICs correspondientes a la muestra a ser analizada para que no influyan en el procesamiento y purificación del ARN con columnas comerciales.

Por otro lado, al analizar la detección del CIC (S-Qb) para el mismo ensayo, se observan valores de DO positivos según el VC en todas las muestras que lo contenían [ya sea que éstas tuvieran valores de CV alta (M1 y M2) o baja (M3; M4 y M5)] y similares a los obtenidos en ausencia de secuencias de HIV-1 lo cual puede visualizarse en los valores de DO de los CN correspondientes (M0).

Finalmente, la utilidad de los CICs como controles de calidad del procedimiento completo se pone de manifiesto en los resultados obtenidos en la muestra M0 para cada ensayo, la cual mimetiza una muestra HIV-negativa. En esta situación, ambos CICs arrojaron valores de DO positivos con la sonda S-Qb indicando la idoneidad de la muestra y la ausencia del virus blanco: valores de DO negativos con las sondas S-Gagp24 (0,049) o SK102 (0,146) específicas para el HIV-1.

De esta forma pudimos verificar la utilización de $Q\beta_{SUD}$ y $Q\beta_{SK}$ como CICs en la detección de HIV-1 por RT-PCR en condiciones de reacción válidas para la amplificación y detección de ambos moldes con muestras clínicas con distintos valores de viremia. Queda aún planteado el desafío de determinar el desempeño del ensayo en evaluación en relación al de referencia en la detección de cepas de circulación regional para lo cual será necesario analizar un número mayor de muestras de individuos positivos y negativos para la infección de HIV-1 de distinta procedencia geográfica. Además queda pendiente la determinación de la sensibilidad analítica del ensayo con el HIV-1 RNA *International Standard* de la OMS como realizado para HCV (ítem 1.10.3), de modo de poder validar el ensayo RT-PCR/SUD/CIC_{SUD} de acuerdo a las pautas establecidas por los organismos de referencia ya sea para su aplicación en el diagnóstico temprano de la infección por HIV-1 como para herramienta NAT en muestras individuales de donantes de sangre que concurren al ámbito público de la provincia de Santa Fe.

Tabla 19. Análisis del desempeño del ensayo en evaluación y de referencia en la detección de la infección por HIV-1.

RT-PCR/SUD/CIC _{SUD}															
DO	CIC _{SUD}	VC	M0 (CN)		M1 (12.200 cop/reac)		M2 (6.100 cop/reac)		M3 (3.100 cop/reac)		M4 (1.850 cop/reac)		M5 (185 cop/reac)		
			NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	
			S-Gagp24	0,242	N (0,024)	N (0,209)	P (2,138)	P (2,252)	P (1,865)	P (1,760)	P (2,236)	P (1,895)	P (1,289)	P (1,342)	P (1,226)
		S-Qb	0,280	N (0,049)	P (2,307)	N (0,117)	P (1,138)	N (0,123)	P (1,365)	N (0,264)	P (2,433)	N (0,205)	P (2,395)	N (0,142)	P (2,376)
RT-PCR/SK/CIC _{SK}															
DO	CIC _{SK}	VC	M0 (CN)		M1 (12.200 cop/reac)		M2 (6.100 cop/reac)		M3 (3.100 cop/reac)		M4 (1.850 cop/reac)		M5 (185 cop/reac)		
			NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	
			SK102	0,278	N (0,033)	N (0,248)	P (2,691)	P (2,491)	P (2,478)	P (2,593)	P (2,581)	P (2,770)	P (1,259)	P (1,220)	P (1,026)
		S-Qb	0,154	N (0,146)	P (1,733)	N (0,112)	P (1,845)	N (0,152)	P (2,001)	N (0,136)	P (1,315)	N (0,189)	P (2,093)	N (0,151)	P (2,606)

Valores de CV obtenidos con el sistema VERSANT® 440 Molecular System desarrollado por Siemens Healthcare Global; VC: valor de corte;
P: positivo; N: negativo

4.2 ESTRATEGIA PARA LA TIPIFICACIÓN MOLECULAR DEL HIV-1

4.2.1 CONSIDERACIONES GENERALES.

La complejidad de la infección por el HIV-1 requiere de esfuerzos continuos que permitan conocer las cepas virales circulantes y su dinámica, de modo de asegurar una eficiente vigilancia genómica en cada región geográfica. Como fue descripto previamente (Ítem 1.8.2), se estima que en Argentina circulan predominantemente el subtipo B y cepas recombinantes constituidas por distintas combinaciones entre los subtipos B y F (CRFs y URFs).

Teniendo en cuenta los patrones observados en los puntos de recombinación entre los subtipos B y F de las CRFs circulantes en la región (Figura 10), la detección de una única región genómica no permite clasificar de manera precisa a la cepa como pura o recombinante. Datos provenientes de estudios basados en la secuenciación de genomas completos del HIV-1 sugieren diferencias en la prevalencia de las infecciones causadas por el subtipo B o por las cepas recombinantes B/F en cuanto a vía de transmisión [98]. Sin embargo, se desconoce la prevalencia real de las cepas circulantes en la mayoría de los infectados ya que estos resultados provienen del análisis de un número discreto de individuos dadas las dificultades metodológicas y el alto costo del equipamiento y de los reactivos requeridos para caracterizar completamente la cepa involucrada [94, 97, 99, 100, 187]. Por otro lado, la ausencia de una vacuna efectiva y la aplicación de la HAART a nivel masivo permiten suponer que se seguirán produciendo nuevas infecciones en el futuro. En este escenario, disponer de una estrategia más sencilla que la secuenciación completa del genoma para tipificar las cepas del HIV-1 permitiría caracterizar los virus circulantes, determinar su relevancia clínica y virológica, y monitorear el ingreso de nuevos subtipos y/o cepas recombinantes a fin de poder controlar con mayor eficiencia la dinámica epidemiológica de la infección por HIV-1 en nuestra región. En base a estas consideraciones, el último objetivo de este trabajo de tesis aborda el desarrollo de una estrategia para evaluar la factibilidad de tipificar las cepas del HIV-1 a través de la temperatura de fusión (T_m) obtenida por el análisis de las curvas de disociación (MCA, del inglés *Melting Curve Analysis*) derivadas de la amplificación de diversas regiones genómicas del virus por PCR en tiempo real (qPCR). Disponer de una herramienta más rápida y económica que el análisis del genoma completo del virus permitiría definir el subtipo de cada región genómica analizada en la muestra del paciente y, por lo tanto, determinar si el virus involucrado en la infección es un subtipo puro o una cepa recombinante.

4.2.2 ESTRATEGIA DE TIPIFICACIÓN MOLECULAR DEL HIV-1 Y DISEÑO EXPERIMENTAL.

La desnaturalización de dímeros de ADN se consigue mediante calentamiento por ruptura de los enlaces de hidrógeno que mantienen las dos hebras de ADN complementarias unidas. La energía requerida para la separación depende de diversos factores, como la longitud de la hebra, su composición nucleotídica y la presencia de cationes monovalentes. Una medida útil de la estabilidad de los dímeros de ADN es la T_m que corresponde al punto medio en la transición observada del estado de doble cadena

(dímero) al estado de cadena sencilla. Esta transición puede ser seguida mediante lecturas espectroscópicas, relacionando la intensidad de la señal (absorbancia, fluorescencia, etc) en función de la temperatura. En la metodología de qPCR se utiliza esta propiedad para evaluar la especificidad de los productos obtenidos en la amplificación cuando se utilizan agentes intercalantes en la química de detección a través del MCA. Los agentes intercalantes emiten una señal fluorescente al unirse a dímeros de ADN, siendo la fluorescencia de fondo o en presencia de ADN simple cadena, muy baja. El Eva Green®, a diferencia del SYBR®Green-I, es un agente intercalante saturante que otorga mayor sensibilidad en la detección, reduciendo la posibilidad de inhibición de la amplificación por altas concentraciones del mismo. Sin embargo, dado que el valor de T_m de cada producto se relaciona con el contenido de GC, el tamaño y la secuencia de los mismos, el MCA puede utilizarse además para discriminar diversos tipos o subtipos virales [188-190]. Martínez *et al* pudieron diferenciar los genotipos US y EU del Virus del Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino (PRRSV, del inglés *Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus*) mediante RT-qPCR seguida de MCA. El análisis de 15 genotipos US y 18 genotipos EU permitió determinar la mediana y el coeficiente de variación (CV) de las T_m para cada genotipo: 82,64 °C (CV = 0.42) para EU y 80,97°C (CV = 0.52) para US. La diferencia en los valores de mediana de las T_m (ΔT_m) de 1,67°C permitió diferenciar ambos genotipos entre 96 muestras clínicas ensayadas [189]. Por otro lado, variaciones de al menos 1°C han sido descriptas para distinguir entre genotipos de distintos patógenos: *Borrelia* sp [191], *Cryptosporidium parvum* [192], Calicivirus felinos [193], *Leishmania* sp [194], capripoxvirus [195] y Papilomavirus humanos [196], entre otros.

En base a estos antecedentes, nos propusimos determinar la factibilidad de tipificar los subtipos y recombinantes del HIV-1 utilizando la T_m obtenida por MCA al amplificar diversas regiones genómicas del virus por qPCR (Figura 30) y, por lo tanto, determinar el subtipo correspondiente de cada una de ellas. Según nuestra hipótesis, la información resultante permitiría estimar la prevalencia de subtipos y recombinantes circulantes en individuos infectados, y detectar de forma rápida variantes virales con circulación poco frecuente en la región para considerar a futuro la caracterización completa del genoma.

Para lograr este objetivo fue necesario definir una Prueba de Referencia que permitiera determinar los subtipos reales (Filogenia) para obtener muestras tipificadas a fin de analizar si las T_m obtenidas empíricamente (Prueba en Evaluación) permitían la discriminación entre los subtipos B y F en las regiones genómicas seleccionadas. En la Tabla 20 se muestra el algoritmo de trabajo para abordar la estrategia propuesta, y las actividades llevadas a cabo se describen a continuación.

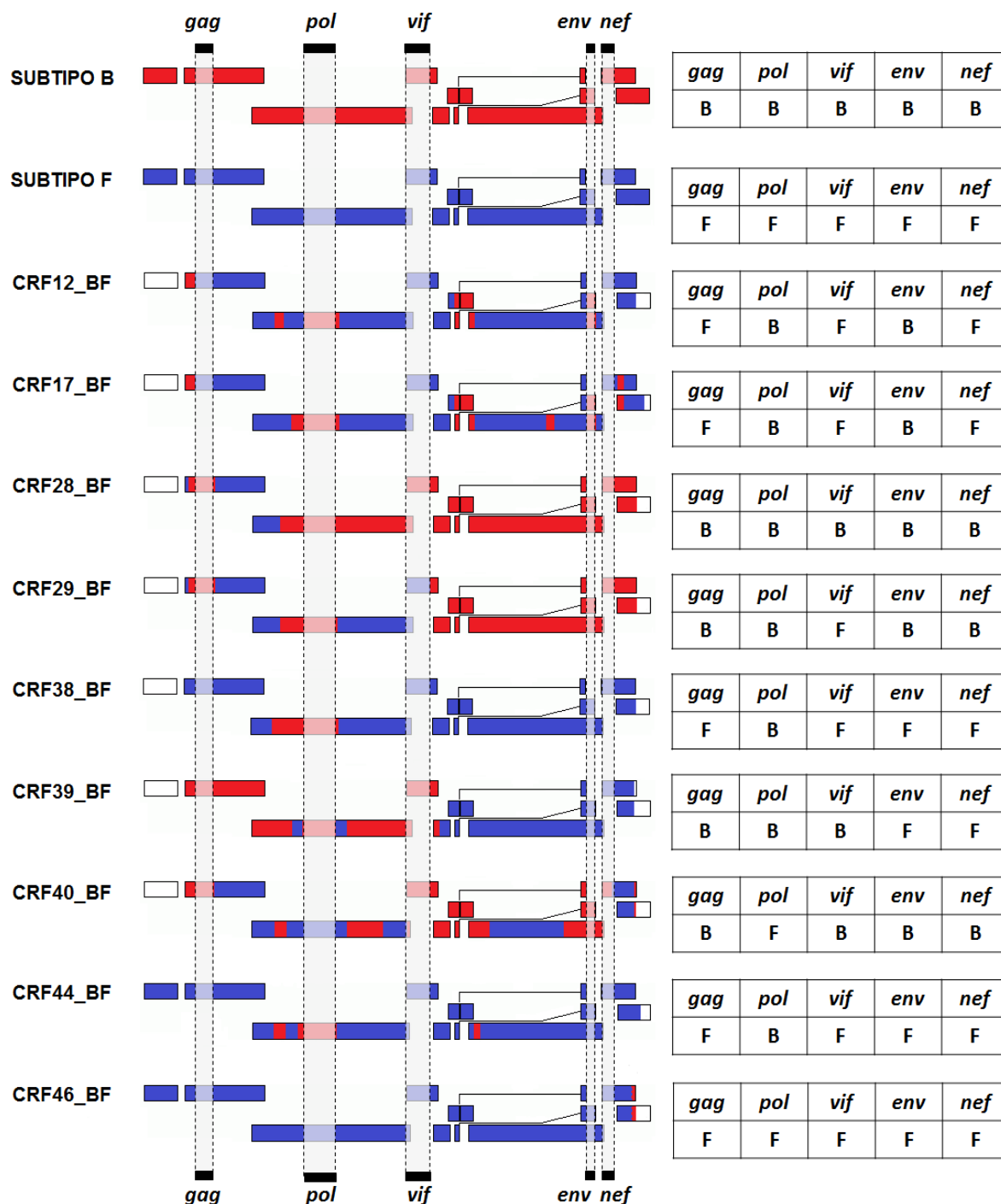


Figura 30. Estrategia para la tipificación de la cepas de HIV-1.

Se esquematizan las regiones del genoma del HIV-1 seleccionadas para discriminar subtipos y recombinantes (izquierda) y los potenciales resultados arrojados en la tipificación de los subtipos puros y de las CRF descriptas en Argentina (derecha).

Tabla 20. Detalle del algoritmo de trabajo para tipificar subtipos de HIV-1 en base a la Tm.

	Prueba en Evaluación: Tm	Prueba de Referencia: Filogenia
	SEGMENTO INTERNO	SEGMENTO EXTERNO
ETAPA IN SILICO	<ol style="list-style-type: none"> Selección de fragmentos de ≈ 200 pb en regiones del genoma de HIV-1 considerando los <i>breakpoints</i> de las CRFs de referencia. Determinación de las Tm teóricas. Selección de los segmentos internos con el siguiente criterio: <i>i)</i> ΔT_m teóricas $\geq 1^\circ\text{C}$ entre subtipos B y F, y <i>ii)</i> ausencia de superposición de los rangos de Tm para cada subtipo definidos como mediana $\pm 1\text{DS}$. Diseño de cebadores para amplificar los fragmentos seleccionados en el punto 3. 	<ol style="list-style-type: none"> Selección de fragmentos de ≈ 450 pb en regiones que contengan a los segmentos internos definidos en la Prueba en Evaluación. Determinación del subtipo de las regiones seleccionadas mediante inferencia bayesiana de los segmentos externos seleccionados. Diseño de cebadores en los fragmentos que presenten inferencia filogenética.
ETAPA EMPÍRICA		<ol style="list-style-type: none"> Desarrollo y optimización de ensayos para la amplificación de los segmentos externos con plásmidos de referencia. Amplificación de los segmentos externos de las regiones seleccionadas en muestras clínicas. <u>Muestra y Metodología:</u> - PBMC: PCR simple o PCRgt. - Plasma: RT-PCR simple. Electroforesis, corte y clonado del fragmento externo en pGEM®-T-Easy. Secuenciación del fragmento externo. Análisis Filogenético. Determinación del Subtipo Real

Tabla 20. Detalle de la estrategia para tipificar subtipos de HIV-1 en base a la Tm (continuación).

	Prueba en Evaluación: Tm	Prueba de Referencia: Filogenia
	SEGMENTO INTERNO	SEGMENTO EXTERNO
ETAPA EMPÍRICA	<p>14. Desarrollo y optimización de ensayos de qPCR para la amplificación de los segmentos internos con plásmidos de referencia.</p> <p>15. Amplificación de los segmentos internos de las regiones seleccionadas a partir de los plásmidos obtenidos en el punto 10 por qPCR simple con agente Intercalante EvaGreen®.</p> <p>16. Determinación de las Tm empírica mediante MCA.</p> <p>17. Construcción de los rangos de variación de las Tm empíricas para los subtipos B y F.</p> <p>18. Tipificación del Subtipo Empírico.</p>	
VALIDACIÓN	<p>17. Generación de una base de datos con las Tm empíricas derivadas de cada región génica analizada en base al subtipo real obtenido por filogenia.</p> <p>18. Construcción de los rangos de Tm empíricas (mediana +/- 1DS) para los subtipos B y F en cada región génica analizada.</p> <p>19. Selección de las regiones génicas que arrojen rangos de Tm empíricas entre los subtipos B y F que no se superpongan entre sí para que puedan ser discriminados ($\Delta Tm \geq 1^{\circ}C$).</p>	

4.2.3 ETAPA IN SILICO.

4.2.3.1 SELECCIÓN DE LAS REGIONES GENÓMICAS DEL HIV-1: SEGMENTO INTERNO.

En primer lugar, se procedió al análisis del genoma completo del HIV-1 con el objetivo de encontrar regiones de aproximadamente 200 pb (segmento interno) que presentasen diferencias en las secuencias nucleotídicas, ya sea en longitud o en contenido GC, entre los subtipos B y F de forma que pudiesen ser discriminadas a través de las Tm (Tabla 20 – ítem 1). Para ello, se generaron alineamientos a partir de las 130 secuencias de cepas aisladas en la región: 77 secuencias correspondientes al subtipo B, 9 secuencias pertenecientes al inter-subtipo F1 y 44 secuencias de las distintas CRF_BF reportadas. Para analizar el número de bases desapareadas respecto a las secuencias de HIV-1 alineadas y el contenido GC de las mismas se utilizaron planillas Excel. En base a este análisis, se seleccionaron 5 regiones dentro del genoma de HIV-1 que cumplieran con el criterio descripto, las cuales se detallan en la Tabla 21.

Tabla 21. Segmentos genómicos (internos) de HIV-1 seleccionados.

REGIONES	POSICIÓN ^[*]	TAMAÑO	SEGMENTO
<i>gag</i>	1075→1330	255 pb	GAG _{INT}
<i>pol</i>	3283 → 3483	202 pb	POL _{INT}
<i>vif</i>	5260→5467	207pb	VIF _{INT}
<i>env</i>	8511→8707	197 pb	ENV _{INT}
<i>nef</i>	9134→9353	220 pb	NEF _{INT}

[*] Posición referida a la cepa de referencia B.FR.83.HXB2 (N° GenBank: K03455).

4.2.3.2 CÁLCULO DE LAS T_m TEÓRICAS DE LOS SEGMENTOS INTERNOS SELECCIONADOS.

Sucesivamente, se determinaron las T_m teóricas de las secuencias seleccionadas correspondientes a los segmentos internos para cada una de las regiones génicas del HIV-1 (GAG_{INT}, POL_{INT}, VIF_{INT}, ENV_{INT} y NEF_{INT}) a fin de evaluar si era factible la discriminación entre subtipos B y F (Tabla 20 – ítem 2). Para calcular las T_m teóricas se utilizaron las siguientes fórmulas:

i) Fórmula de Owen [197]

$$T_m (^{\circ}C) = 87,16 + 0,345 \cdot (\%GC) + \log_{10} ([Na^{+}] \cdot (20,17 - 0,066 \cdot (\%GC)))$$

donde %GC: porcentaje de nucleótidos G y C.

ii) Fórmula de Wetmur [198]:

$$T_m (^{\circ}C) = 81,5 + 16,6 \cdot \log_{10} ([Na^{+}] / (1 + 0,7 \cdot [Na^{+}] + 0,41 \cdot (\%GC) - 500/L)$$

donde %GC: porcentaje de nucleótidos G y C, y L: longitud del fragmento en pares de bases.

iii) Fórmula von Ahsen & Witter [199]:

$$T_m (^{\circ}C) = 80,4 + 0,345 \cdot (\%GC) + \log_{10} ([K^{+}] + 4 \cdot \sqrt{[Mg^{2+}]} \cdot (17,0 - 0,135 \cdot (\%GC)) - 500/L$$

donde %GC: porcentaje de nucleótidos G y C, y L: longitud del fragmento en pares de bases.

Se realizaron los cálculos correspondientes para los genes definidos (Figura 30 y Tabla 21), y los resultados obtenidos con cada una de las fórmulas aplicadas se detallan en la Tabla 22. Si bien los cálculos realizados con las distintas fórmulas arrojan diferencias en los valores absolutos de las T_m en cada fragmento génico, las ΔT_m entre los subtipos B y F obtenidos muestran valores similares. En base a estos resultados, se seleccionó la fórmula de von Ahsen & Witter para definir las T_m teóricas de referencia para los sucesivos experimentos ya que esta fórmula considera las concentraciones de cationes mono y divalentes y, por lo tanto, se ajusta más a la realidad biológica de la muestra.

Los resultados de este análisis teórico muestran que 3 de las 5 regiones génicas analizadas cumplían el criterio establecido (Tabla 20 – ítem 3) para que la diferenciación entre los subtipos B y F sea factible.

Tabla 22. Cálculo de las Tm (°C) teóricas de los segmentos internos correspondientes a las distintos genes seleccionados del HIV-1.

Región	Subtipo	% GC mediana ± DS	Longitud (pb) mediana ± DS	Fórmula de <i>Wetmur</i>		Fórmula de <i>Owen</i>		Fórmula de von Ahsen & Witter	
				Tm (°C) mediana ± DS [rango]	ΔTm (°C)	Tm (°C) mediana ± DS [rango]	ΔTm (°C)	Tm (°C) mediana ± DS [rango]	ΔTm (°C)
<i>gag</i>	B	44,14 ± 1,29	256 ± 5	86,15 ± 0,54 [85,61 – 86,69]	0,92	90,82 ± 0,50 [90,32 – 91,32]	0,90	86,03 ± 0,50 [85,53 – 86,53]	0,92
	F1	42,62 ± 1,10	244 ± 6	85,23 ± 0,36 [84,87 – 85,59]		89,92 ± 0,40 [89,52 – 90,32]		85,11 ± 0,38 [84,73 – 85,49]	
<i>pol</i>	B	40,10 ± 1,20	202 ± 0	83,07 ± 0,49 [82,58 – 83,56]	0,10	88,93 ± 0,47 [88,46 – 89,40]	0,10	83,53 ± 0,52 [83,01 – 84,05]	0,10
	F1	39,85 ± 0,93	202 ± 1	82,97 ± 0,44 [82,53 – 83,41]		88,83 ± 0,42 [88,41 – 89,25]		83,43 ± 0,47 [82,96 – 83,90]	
<i>vif</i>	B	40,38 ± 1,17	208 ± 1	83,26 ± 0,48 [82,78 – 83,74]	1,32	89,04 ± 0,46 [88,58 – 89,50]	1,26	83,74 ± 0,51 [83,23 – 84,25]	1,41
	F1	43,62 ± 1,20	208 ± 1	84,58 ± 0,49 [84,09 – 85,07]		90,30 ± 0,47 [89,83 – 90,77]		85,15 ± 0,52 [84,63 – 85,67]	
<i>env</i>	B	48,99 ± 1,64	198 ± 1	86,37 ± 0,67 [85,70 – 87,04]	0,49	92,50 ± 0,64 [91,86 – 93,14]	0,40	86,93 ± 0,46 [86,47 – 87,39]	0,44
	F1	48,74 ± 0,84	198 ± 0	86,86 ± 0,32 [86,54 – 87,18]		92,10 ± 0,33 [91,77 – 92,43]		87,37 ± 0,17 [87,2 – 87,54]	
<i>nef</i>	B	48,87 ± 1,54	221 ± 4	86,88 ± 0,63 [86,25 – 87,51]	1,56	92,35 ± 0,60 [91,75 – 92,95]	1,53	87,41 ± 0,43 [86,98 – 87,84]	1,45
	F1	50,23 ± 1,27	221 ± 0	88,44 ± 0,52 [87,92 – 88,96]		93,88 ± 0,50 [93,38 – 94,38]		88,86 ± 0,42 [88,44 – 89,28]	
(#) mediana ± desvío estándar									

Brevemente, los segmentos internos seleccionados para los genes *gag*, *vif* y *nef* arrojaron valores de ΔT_m teóricas $\geq 1^\circ\text{C}$ ($0,92^\circ\text{C}$, $1,41^\circ\text{C}$ y $1,45^\circ\text{C}$, respectivamente), y valores de T_m mínimos y máximos que no se superponían entre los subtipos B y F (GAG_{INT} : $86,03^\circ\text{C} \pm 0,50^\circ\text{C}$ para B y $85,11^\circ\text{C} \pm 0,38^\circ\text{C}$ para F1; VIF_{INT} : $83,74^\circ\text{C} \pm 0,51^\circ\text{C}$ para B y $85,15^\circ\text{C} \pm 0,52^\circ\text{C}$ para F1; y NEF_{INT} : $87,41^\circ\text{C} \pm 0,43^\circ\text{C}$ para B y $88,86^\circ\text{C} \pm 0,42^\circ\text{C}$ para F1), por lo que podrían ser discriminados mediante análisis por qPCR y MCA. En contraste, las regiones seleccionadas de los segmentos internos correspondientes a los genes *pol* y *env* arrojaron valores de $\Delta T_m < 0,5^\circ\text{C}$ ($0,10^\circ\text{C}$ y $0,44^\circ\text{C}$, respectivamente) y superposición en los rangos de T_m (POL_{INT} : $83,53^\circ\text{C} \pm 0,52^\circ\text{C}$ para B y $83,43^\circ\text{C} \pm 0,47^\circ\text{C}$ para F1; ENV_{INT} : $86,93^\circ\text{C} \pm 0,46^\circ\text{C}$ para B y $87,37^\circ\text{C} \pm 0,17^\circ\text{C}$ para F1), por lo que no serían adecuados para discriminar entre los subtipos B y F en base a la estrategia planteada y, por lo tanto, ambas regiones génicas fueron descartadas para futuros análisis.

En base a estos resultados, los segmentos GAG_{INT} , VIF_{INT} y NEF_{INT} fueron seleccionados como regiones candidatas para la tipificación de cepas del HIV-1 con la estrategia propuesta. La secuencia de los cebadores diseñados para la amplificación de cada segmento interno (Tabla 20 – ítem 4) se describe en el Anexo 3 y las condiciones de amplificación en el ítem 3.8.

4.2.3.3 PRUEBA DE REFERENCIA: SELECCIÓN DE LOS SEGMENTOS EXTERNOS DE *gag*, *vif* y *nef* PARA EL ANÁLISIS DE LA INFERENCIA FILOGENÉTICA.

Una vez seleccionados los segmentos internos que cumplían con el criterio establecido (GAG_{INT} , VIF_{INT} , y NEF_{INT} , Tabla 20 – ítem 3), se procedió a analizar regiones de aproximadamente 450 pb en los mismos genes que incluyeran a los segmentos internos (segmentos externos: GAG_{EXT} , VIF_{EXT} , y NEF_{EXT}), para ser utilizados en estudios de inferencia filogenética con el fin de determinar el subtipo del HIV-1 en dicha región genómica (Tabla 20 – ítem 5). Por lo tanto, el subtipo obtenido a través de la caracterización de los segmentos externos será considerado el “subtipo real” y permitiría validar los resultados obtenidos con la estrategia de tipificación propuesta en este trabajo a través de las T_m obtenidas mediante qPCR-MCA. Utilizando el alineamiento realizado en el ítem 4.2.3.1, se seleccionaron los segmentos externos correspondientes para cada uno de los genes en estudio, los cuales se detallan en la Tabla 23.

Tabla 23. Segmentos externos de HIV-1 seleccionados para análisis filogenéticos.

REGIONES	POSICIÓN	TAMAÑO	SEGMENTO
<i>gag</i>	1075→1530	450 pb	GAG_{EXT}
<i>vif</i>	5043→5467	425 pb	VIF_{EXT}
<i>nef</i>	8963→9353	391 pb	NEF_{EXT}

[*] Posición referida a la cepa de referencia B.FR.83.HXB2 (N° GenBank: K03455).

Sucesivamente se realizaron alineamientos con los 39 secuencias pertenecientes a los subtipos o inter-subtipos de referencia para el HIV-1 grupo M (A1, A2, B, C, D, F1, F2, G, H, J y K) y 2 secuencias del grupo

P, se determinó el modelo evolutivo apropiado para cada uno de ellos (Ítem 3.9.2) y, finalmente, se confeccionaron los árboles para cada región mediante inferencia bayesiana (Ítem 3.9.2). Los resultados obtenidos de este análisis (Figura 31) indican que es posible diferenciar los distintos subtipos virales del HIV-1 utilizando los fragmentos GAG_{EXT}, VIF_{EXT} y NEF_{EXT}.

Así, por medio de este análisis *in silico* (cálculo de la T_m con la fórmula de von Ahsen & Witter y caracterización en subtipos mediante inferencia filogenética) se corroboró de forma teórica que:

- i) la variabilidad en las secuencias nucleotídicas de los fragmentos internos (GAG_{INT}, VIF_{INT} y NEF_{INT}), que se traduce en diferencias de T_m, permitiría utilizar qPCR-MCA para diferenciar entre los subtipos B y F.
- ii) los segmentos externos (GAG_{EXT}, VIF_{EXT} y NEF_{EXT}) presentan información filogenética suficiente como para discriminar entre los distintos subtipos del HIV-1 y, por lo tanto, definir el “subtipo real”.

4.2.3.4 DISEÑO DE CEBADORES PARA LA AMPLIFICACION DE SEGMENTOS INTERNOS Y EXTERNOS.

Una vez definidos los segmentos internos (GAG_{INT}, VIF_{INT} y NEF_{INT}) para aplicar la prueba en evaluación y externos (GAG_{EXT}, VIF_{EXT} y NEF_{EXT}) para determinar el “subtipo real” mediante inferencia filogenética se procedió al diseño de los cebadores correspondientes para abordar la etapa empírica (Tabla 20 – ítem 4 y e ítem 7, respectivamente).

En el diseño de los cebadores para amplificar los segmentos externos se trabajó con el apilamiento de 1.745 secuencias nucleotídicas utilizada anteriormente para los cebadores ALL (ítem 4.1.2), con el objetivo de cubrir el espectro de cepas circulantes a nivel global. Con respecto a los cebadores utilizados para amplificar los segmentos internos, se empleó el apilamiento de las secuencias reportadas para los subtipos y CRFs circulantes en los países del cono sur (Argentina, Brasil, Uruguay, Bolivia y Chile) empleadas en el diseño de los cebadores SUD (ítem 4.1.2), a fin de cubrir el espectro de cepas circulantes a nivel regional. La elección de los cebadores candidatos se realizó mediante diversas herramientas bioinformáticas como se describió previamente (Ítem 3.9.1).

Por medio de estas herramientas se seleccionaron 6 pares de cebadores para amplificar los segmentos externos (GAG_{EXT}, VIF_{EXT} y NEF_{EXT}) e internos (GAG_{INT}, VIF_{INT} y NEF_{INT}), detallados en la Tabla 24 y cuyas secuencias se muestran en el Anexo 3.

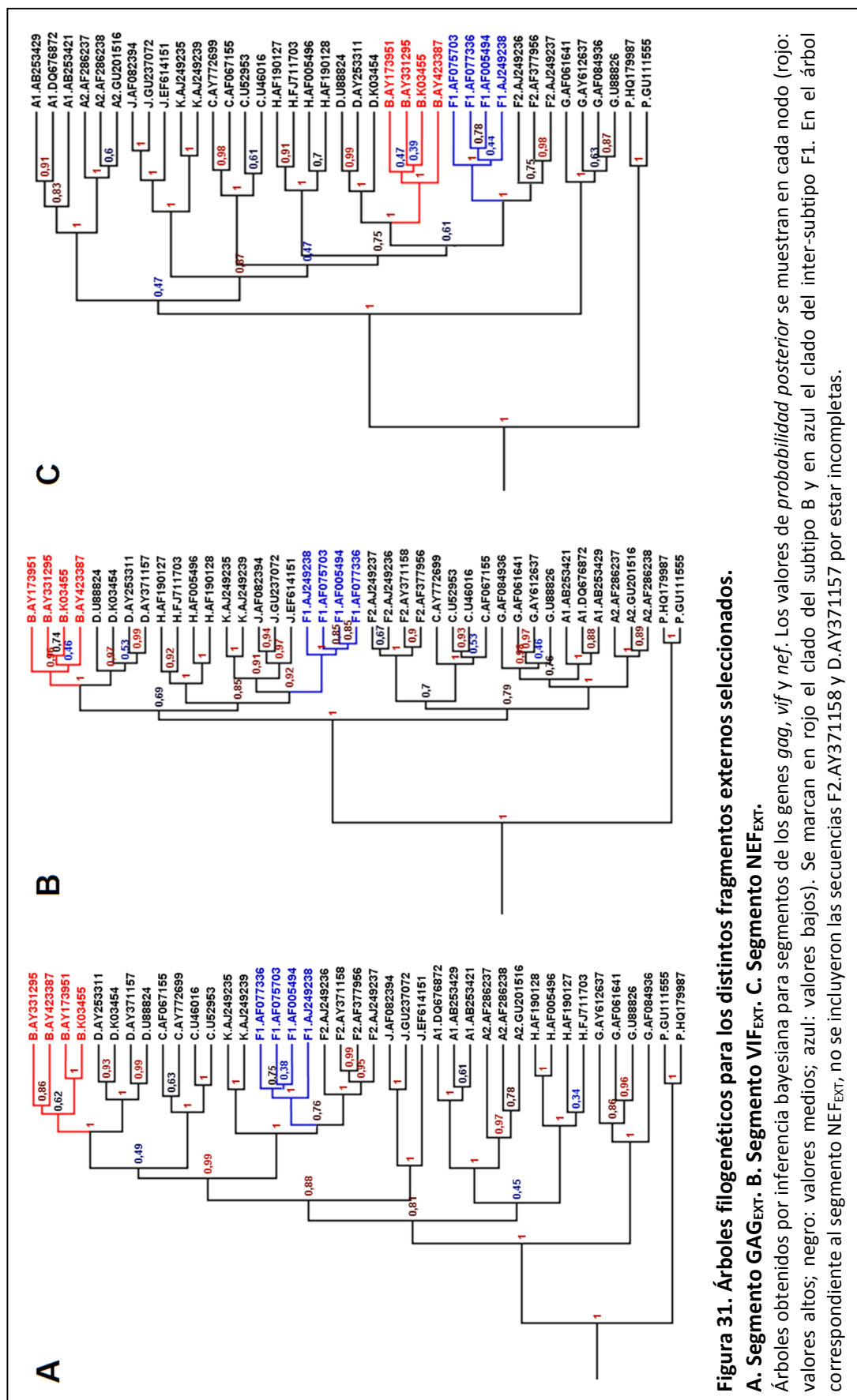


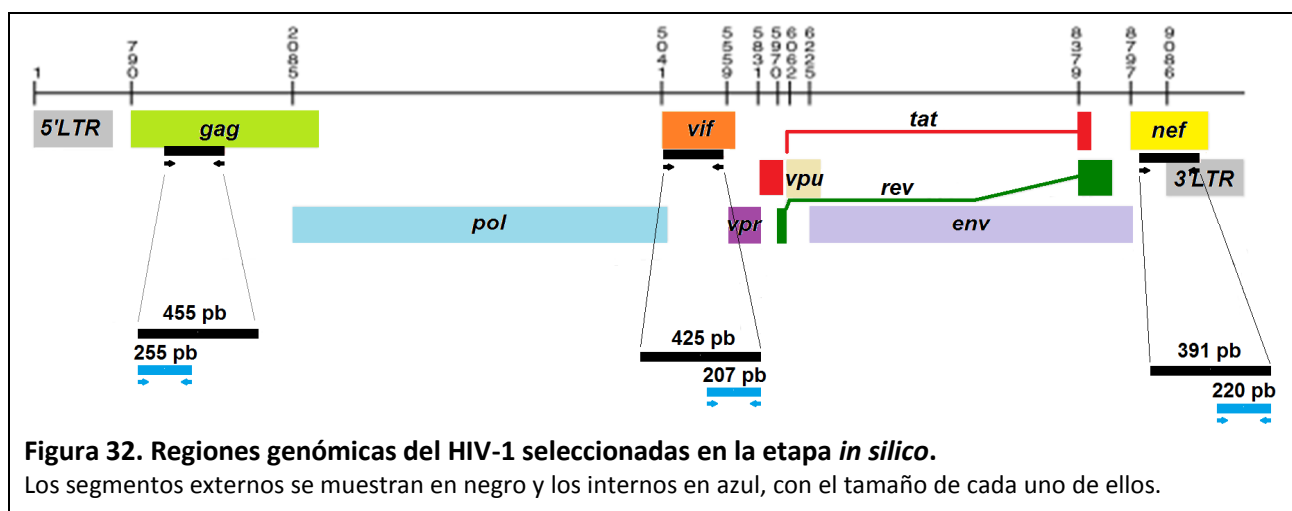
Tabla 24. Cebadores diseñados para amplificar los segmentos internos y externos.

	SEGMENTO EXTERNO				
	CS		CAS		Tamaño del producto
Regiones del HIV-1	Nombre	Posición ^[*]	Nombre	Posición ^[*]	
<i>gag</i>	GagSense	1075→1094	SUD-R1	1510→1530	455 pb
<i>vif</i>	VIF102	5042→5061	VIF301	5448→5467	425 pb
<i>nef</i>	NEF-F1	8962→8981	NEF-R1	9334→9353	391 pb

	SEGMENTO INTERNO				
	CS		CAS		Tamaño del producto
Regiones del HIV-1	Nombre	Posición ^[*]	Nombre	Posición ^[*]	
<i>gag</i>	GagSense	1075→1094	Gag-X	1309→1330	255 pb
<i>vif</i>	VIF-F2	5260→5279	VIF301	5448→5467	207pb
<i>nef</i>	NEF-F2	9133→9152	NEF-R1	9334→9353	220 pb

[*] Posición referida a la cepa de referencia B.FR.83.HXB2 (N° GenBank: K03455).
CS: cebador sentido. CAS: cebador antisentido.

La Figura 32 resume las regiones seleccionadas en el genoma de HIV-1 mediante análisis *in silico* para la amplificación de los segmentos internos que cumplían con el criterio establecido en base al cálculo de las Tm teóricas (Tabla 20 – ítem 3 e Ítem 4.2.3.2) y de los segmentos externos correspondientes que presentaban inferencia filogenética (Ítem 4.2.3.3).



4.2.4 ETAPA EMPÍRICA.

Una vez diseñados los cebadores para amplificar los segmentos externos e internos se procedió a optimizar las condiciones de reacción para la amplificación de cada uno de ellos con las siguientes estrategias analíticas:

- i) segmentos externos (GAG_{EXT} , VIF_{EXT} y NEF_{EXT}): PCR (simple y PCRgt) y RT-PCR (Tabla 20 – ítem 8 y 9).
- ii) segmentos internos (GAG_{INT} , VIF_{INT} y NEF_{INT}): qPCR seguida de MAC (Tabla 20 – ítem 14, 15 y 16).

Durante el proceso de optimización de las reacciones de amplificación de ADN, se utilizaron en todos los casos diluciones de los plásmidos pNL4-3 y p93BR020.1 preparadas en una matriz de ADN de placenta humana para mimetizar muestras conteniendo los subtipos B y F, respectivamente, y muestras de PBMC derivadas de individuos positivos y negativos para HIV-1 de la colección del laboratorio. En cada experimento se utilizó agua estéril como CR y ADN de placenta humana como CN. El criterio utilizado para determinar las condiciones adecuadas de amplificación de los segmentos externos (GAG_{EXT} , VIF_{EXT} y NEF_{EXT}) fue seleccionar aquellas que presentaran bandas de mayor intensidad en geles de agarosa y tinción de bromuro de etidio para los CP (plásmidos de referencia y/o PBMC HIV-positivos). Por otro lado, el criterio para definir las condiciones óptimas de amplificación de los segmentos internos (GAG_{INT} , VIF_{INT} y NEF_{INT}) fue dada por la ausencia de dímeros de cebadores (*primers dimers*) como producto espurio de reacción. Finalmente, las condiciones óptimas obtenidas en las reacciones de amplificación de ADN se adaptaron al formato de RT-PCR para amplificar ARN a partir de muestras de plasma. A continuación se describen de manera detallada las actividades llevadas a cabo para optimizar y analizar los segmentos correspondientes al gen *gag*.

4.2.4.1 TIPIFICACIÓN DE LA REGION *gag* DEL HIV-1.

4.2.4.1.1 ENSAYOS PARA LA AMPLIFICACIÓN DEL SEGMENTO EXTERNO (GAG_{EXT}).

Para la optimización del ensayo PCR/ GAG_{EXT} , en un primer lugar, se experimentaron distintas concentraciones de $MgCl_2$ (1,5 mM, 2,0 mM y 2,5 mM) y de T_H de los cebadores (T_H : 50°C, 55°C y 59°C) a fin de hallar las condiciones adecuadas de amplificación. Los productos amplificados en cada condición se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa (Figura 33A) y muestran que 2,5 mM y 59°C son las condiciones óptimas de concentración de $MgCl_2$ y de T_H , respectivamente, ya que arrojan las bandas más intensas.

Luego, se determinó la concentración adecuada de dNTPs y de cebadores. Los resultados obtenidos (Figura 33B) indican que: i) 600 μM es la concentración óptima de dNTPs con respecto a los 400 μM utilizados anteriormente, y ii) la concentración de cada cebador empleada (0,6 μM) era la adecuada para la amplificación.

En base al conjunto de experimentos realizados se obtuvieron las condiciones óptimas del ensayo PCR/ GAG_{EXT} , las cuales se detallan en el ítem 3.7.1.1.

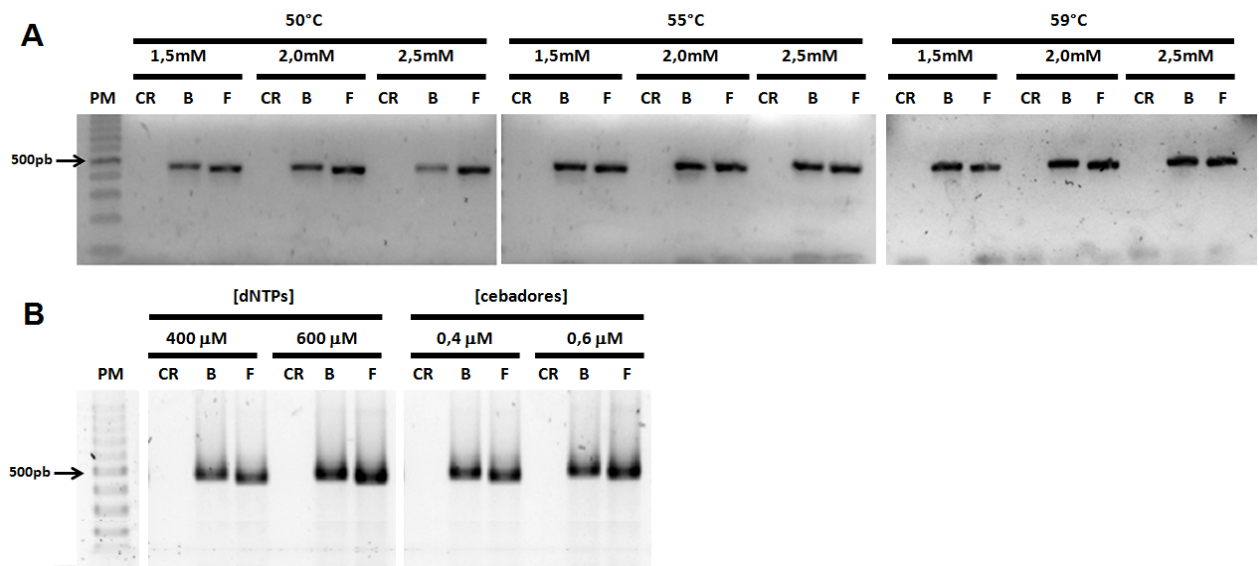


Figura 33. Optimización del ensayo PCR/GAG_{EXT} para la amplificación del segmento GAG_{EXT}.

A. Concentración de MgCl₂ y T_H. B. Concentración de dNTPs y cebadores.

PM: marcador de peso molecular; CR: control de reactivos; B: 5.000 copias/reacción del plásmido pNL4-3; F: 5.000 copias/reacción del plásmido p93BR020.1

Posteriormente, procedimos a evaluar el desempeño del ensayo PCR/GAG_{EXT} en muestras clínicas para lo cual se analizaron 40 muestras de PBMC derivadas de individuos HIV-positivos (HIV+) de la colección del laboratorio. Con esta estrategia pudieron amplificarse 21/40 (52%) de las muestras analizadas. Además se observó un elevado número de bandas inespecíficas de diferentes tamaños en muchas de las muestras de PBMC amplificadas. A modo de ejemplo, se muestran algunas de las muestras ensayadas en la Figura 34. Las bandas inespecíficas dificultan el corte de la banda de tamaño esperado (455 pb) que se utilizará para purificar el ADN y su posterior clonado en el vector pGEM®-T-*Easy* por lo que fue necesario mejorar el desempeño y la sensibilidad del ensayo PCR/GAG_{EXT}.

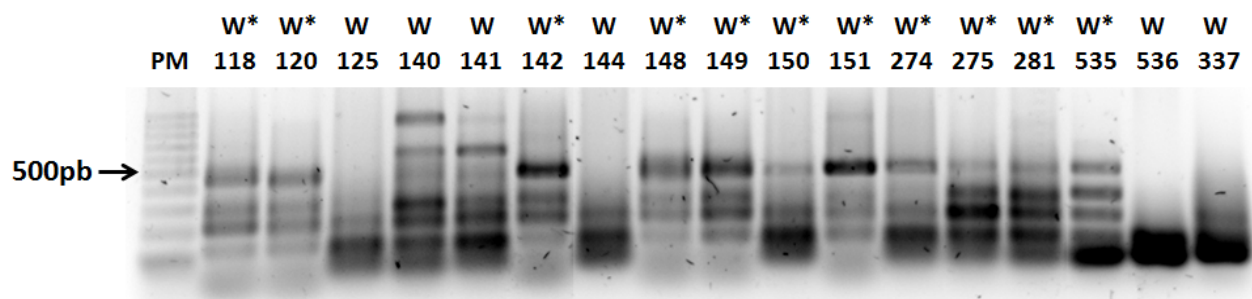


Figura 34. Desempeño del ensayo PCR/GAG_{EXT} en la detección de ADN proviral en muestras clínicas.

Se señalan con asterisco (*) aquellas muestras de las que se pudo cortar la banda de 455 pb. Se muestran a modo de ejemplo algunas de las muestras estudiadas. PM: marcador de peso molecular

Teniendo en cuenta estos resultados y considerando que el número de copias de ADN proviral presente en las muestras de PBMC es bajo (1 a 5 log₁₀ copias en 1x10⁶ PBMC) [200-202], se decidió aumentar la sensibilidad de detección por medio de un ensayo de “PCR de la gota colgante” (PCRgt/GAG_{EXT}) el cual es una variación de la “PCR anidada” desarrollada para el diagnóstico rápido del

Virus Respiratorio Sincicial [167] y fue empleado ampliamente en nuestro laboratorio para la identificación de HPV cutaneotrópicos [168]. Esta estrategia fue pensada para reducir el riesgo de contaminación por amplicones de PCR precedentes o “*carry-over*” que se genera al abrir los tubos en la segunda ronda de amplificación.

Brevemente, la técnica de PCRgt (Figura 35 – Ítem 3.7) consiste en la preparación de 2 mezclas de reacción (MIX I y MIX II). La MIX I se agrega en el fondo del tubo de PCR junto con la muestra y una gota de aceite mineral, mientras que la MIX II se agrega a la tapa del tubo. Ambas mezclas de reacción contienen todos los reactivos necesarios para la amplificación de forma que una vez cerrado el tubo no se vuelve a abrir en la segunda ronda de amplificación. La primera ronda de amplificación (Perfil I) se realiza sin calentar la tapa del termociclador para evitar la evaporización de la MIX II, mientras el aceite mineral evita la evaporación de la MIX I. Luego de la primera ronda de amplificación, el tubo de PCR se centrifuga a alta velocidad para poner en contacto la MIX II con la primera reacción y el conjunto es sometido a la segunda ronda de amplificación (Perfil II).



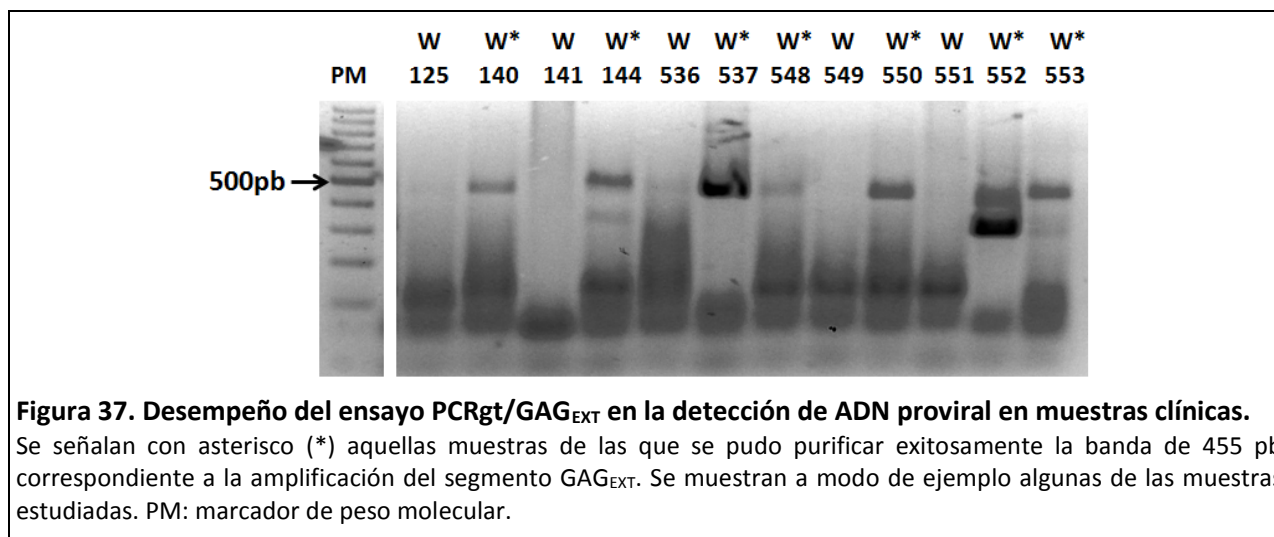
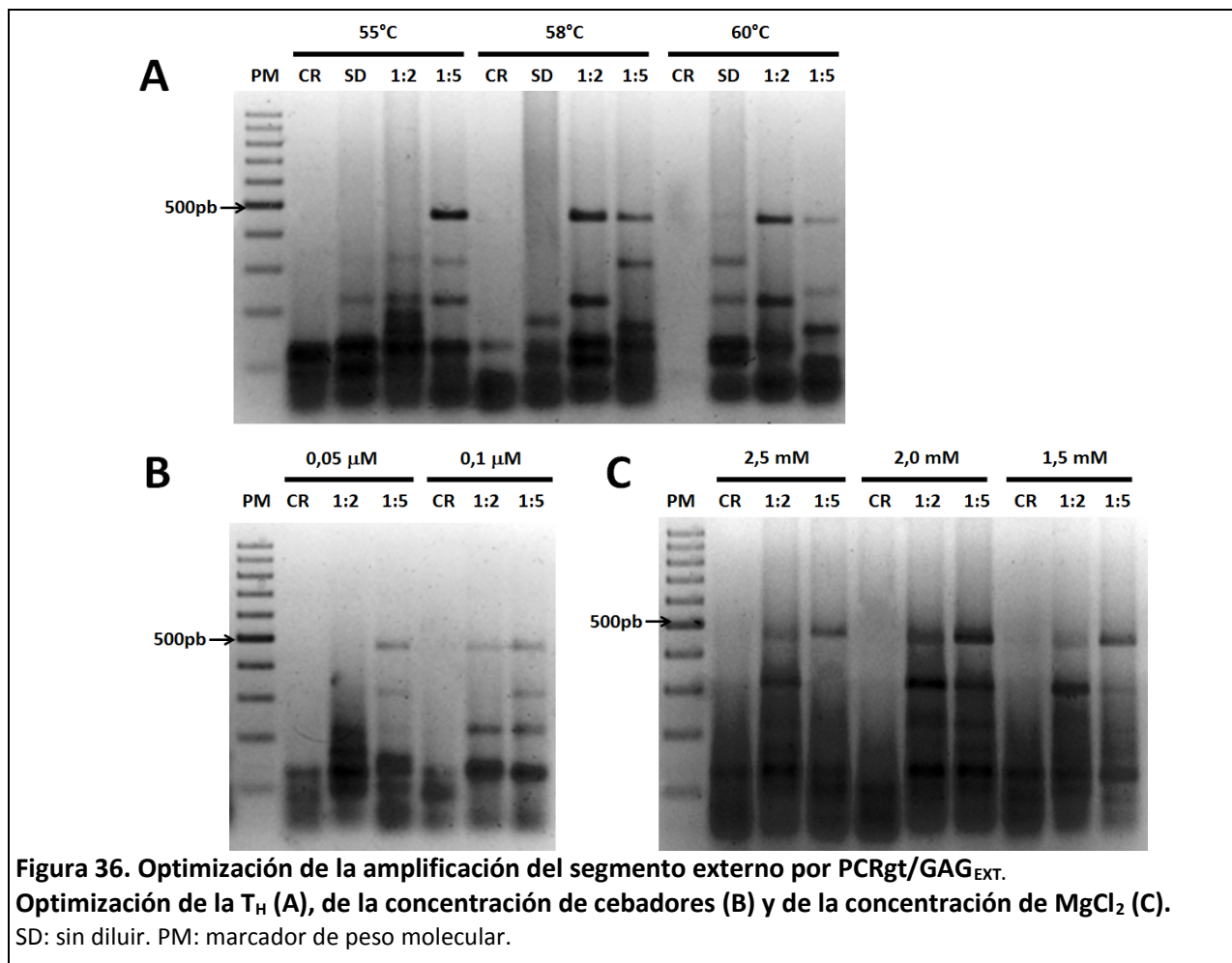
Figura 35. Esquema experimental del ensayo de PCR de la gota colgante (PCRgt).

Para la optimización del ensayo PCRgt/GAG_{EXT} se priorizó encontrar las mejores condiciones de reacción de la MIX I y del Perfil I, ya que son parámetros críticos para poder lograr una mejor sensibilidad analítica. A partir de distintas diluciones de PBMC de un individuo HIV+ (1:2 y 1:5), se procedió a la optimización de: i) la T_H (Figura 36A: 55°C, 58°C y 60°C), ii) la concentración de los cebadores (Figura 36B: 0,05 μ M y 0,1 μ M), y iii) la concentración de $MgCl_2$ (Figura 36C: 1,5 mM, 2,0 mM y 2,5 mM), manteniendo fijos los otros parámetros de la reacción (*Buffer* KCl 1X, [dNTPs]: 200 μ M y 1 U de ADN Taq Polimerasa). Las condiciones que arrojaron las bandas más intensa en ambas diluciones de la muestra correspondieron a una $T_H = 58^\circ C$, 0,1 μ M de cada cebador y 2,0 mM de $MgCl_2$. Las condiciones óptimas del ensayo PCRgt/GAG_{EXT} se detallan en el Ítem 3.7.1.1.

A continuación, procedimos a evaluar el ensayo en las 19 muestras clínicas que no pudieron ser amplificadas por el ensayo PCR/GAG_{EXT}. Mediante el ensayo PCRgt/GAG_{EXT} se pudieron detectar 13/19 (68%) de las muestras de PBMC y se logró una mayor especificidad en la reacción, como puede observarse en la Figura 37 para algunas de las muestras analizadas.

Si analizamos en conjunto la eficiencia los ensayos PCR/GAG_{EXT} y PCRgt/GAG_{EXT} para la detección del ADN proviral, se concluye que se pudo amplificar el fragmento genómico deseado en el 85% de las muestras clínicas analizadas (34/40). En base a estos resultados, se adoptó una estrategia similar para la amplificación de los segmentos VIF_{EXT} y NEF_{EXT} (datos no mostrados). Es decir, utilizar la técnica de “PCR

de la gota colgante” en aquellas muestras en donde la PCR simple hubiera dado un resultado negativo a fin de aumentar el número de muestras disponibles para tipificar. Las condiciones finales para la amplificación de los segmentos VIF_{EXT} y NEF_{EXT} con las distintas estrategias (PCR simple o PCRgt) se describen en los Ítems 3.7.2.1 y 3.7.3.1, respectivamente.



Una vez optimizadas las condiciones de reacción con los plásmidos de referencia y probado el sistema en ADN proviral, se adaptó el ensayo para la amplificación de ARN del HIV-1 en muestras de plasma. Las condiciones de reacción para el ensayo RT-PCR/GAG_{EXT} se detallan en el Ítem 3.7.1.2. Se analizaron 25 muestras de plasma, de la colección disponible en el laboratorio, de individuos HIV-positivos (HIV+) con cargas virales conocidas (CV promedio: 116.946 copias/ml; rango: 12.663 – 485.239 copias/ml). La extracción del ARN viral se realizó como se describe en el Ítem 3.4.2. Mediante el ensayo RT-PCR/GAG_{EXT} pudieron obtenerse bandas del tamaño deseado en el 96% (24/25) de las muestras estudiadas y no se observó la aparición de bandas inespecíficas (Figura 38).

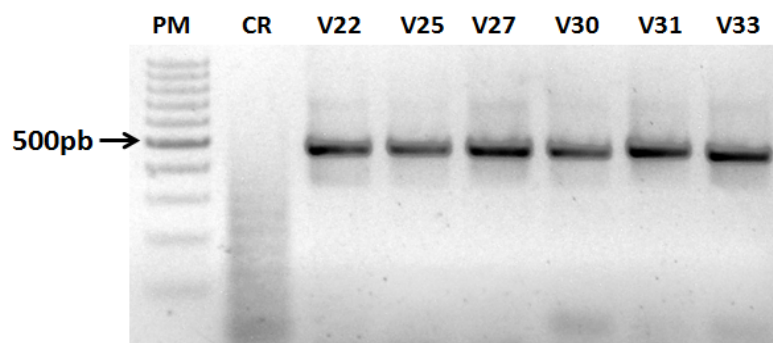


Figura 38. Desempeño del ensayo RT-PCR/GAG_{EXT} en la detección de ARN-HIV-1 en plasma.

Se muestran a modo de ejemplo algunas de las muestras estudiadas. PM: marcador de peso molecular. CR: control de reactivos.

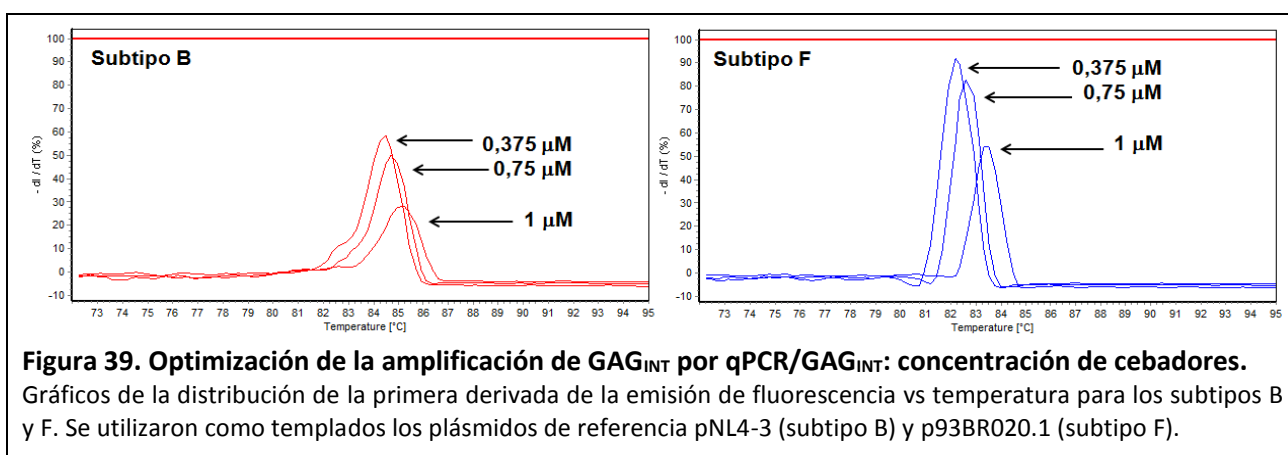
4.2.4.1.2 ENSAYOS PARA LA AMPLIFICACIÓN DEL SEGMENTO INTERNO (GAG_{INT}).

Para la optimización del ensayo qPCR/GAG_{INT}, se determinaron los siguientes parámetros críticos de la reacción: *i*) T_H y concentración de los cebadores GagSense/Gag-X (Anexo 1), *ii*) concentración de MgCl₂, y *iii*) la rampa de captación de señal fluorescente de la curva de disociación de los productos amplificados.

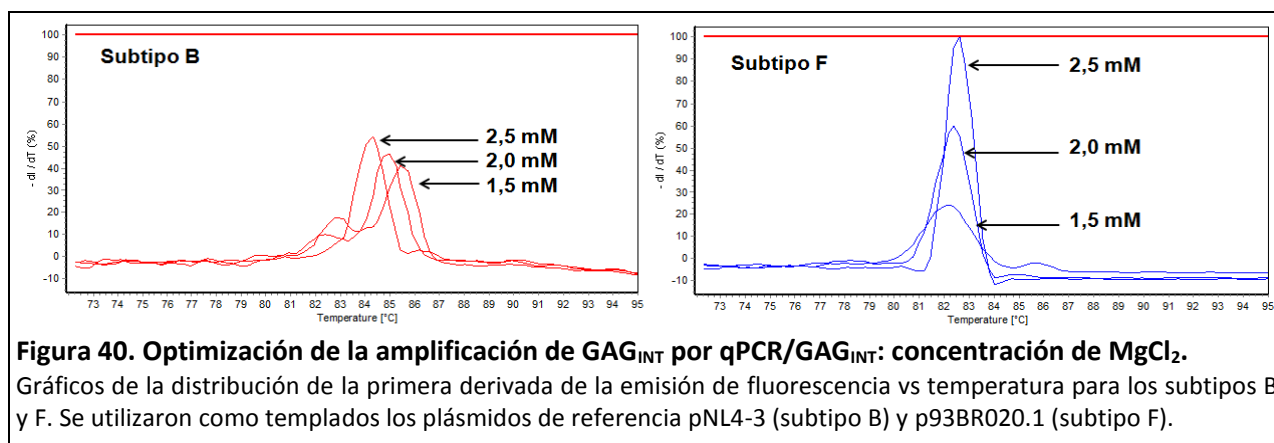
En los ensayos de qPCR los procesos de amplificación y detección se monitorean en forma simultánea en el mismo tubo cerrado a través de la emisión de fluorescencia a medida que la síntesis de ADN avanza. De esta manera, la emisión de fluorescencia producida en el transcurso de la reacción permite conocer y registrar en todo momento la cinética de la reacción de amplificación. Los dispositivos para qPCR permiten determinar un umbral de fluorescencia a partir del cual se obtiene el “ciclo umbral” (C_T) que corresponde al momento en que los amplicones generados en la reacción alcanzan una cantidad tal que la fluorescencia emitida supera el umbral determinado por el operador. Considerando esto, cuando se ensayan distintas condiciones con una cantidad fija de templado (500 copias/reacción de cada plásmido), aquella condición con la que se obtenga el menor C_T, será la que aportará la mayor sensibilidad a la reacción. Como el objetivo de este trabajo es poder discriminar los subtipos B y F del HIV-1 mediante MCA, se priorizaron aquellas condiciones en las cuales: *i*) las ΔT_m para cada subtipo eran mayores, y *ii*) la

distribución sobre el eje de las abscisas de las curvas de disociación eran las menos amplias. Estas 2 condiciones minimizarían el solapamiento de ambas curvas.

Se comenzó con la optimización de la concentración de los cebadores trabajando con 0,375 μM , 0,75 μM y 1 μM de cada cebador, con una concentración de MgCl_2 de 1,5 mM. El perfil de amplificación incluyó una desnaturalización inicial (2 min a 95°C) seguida de 35 ciclos de amplificación (25" a 95°C, 25" a 55°C y 25" a 72°C), y síntesis final de 2 min a 72°C. Las lecturas de fluorescencia de los experimentos se realizaron al final del paso de extensión, a una temperatura de 72°C. La curva de disociación de los productos amplificados se realizó en un rango de 95°C a 60°C utilizando una rampa de 0,3°C/segundo. Los resultados de este experimento se muestran en la Figura 39 e indican que 0,375 μM es la concentración óptima de cebadores para el ensayo qPCR/GAG_{INT}.



Una vez determinado este parámetro, se continuó el proceso de puesta a punto analizando distintas concentraciones de MgCl_2 . Esto fue necesario ya que la Mezcla Real (*Biodynamics*) contiene el agente intercalante EvaGreen® el cual actúa como quelante de Mg^{2+} , por lo que se calcula una concentración efectiva de MgCl_2 de 1,5 mM en el tubo de reacción. Por lo tanto, para determinar la concentración óptima de MgCl_2 se ensayaron distintas concentraciones (1,5 mM, 2,0 mM y 2,5 mM), utilizando 0,375 μM de cada cebador y el perfil térmico antes descrito. Como se observa en la Figura 40, 2,5 mM sería la concentración óptima de MgCl_2 .



Finalmente, se determinó la T_H de los cebadores más adecuada para el ensayo. Se probaron 3 condiciones (55°C, 57°C y 60°C) utilizando los parámetros optimizados anteriormente (0,375 μ M de cada cebador y 2,5 mM de $MgCl_2$), y manteniendo el perfil térmico. Los resultados (Figura 41) indican que se logra una mayor eficiencia en la amplificación cuando se emplea una T_H de 55°C.

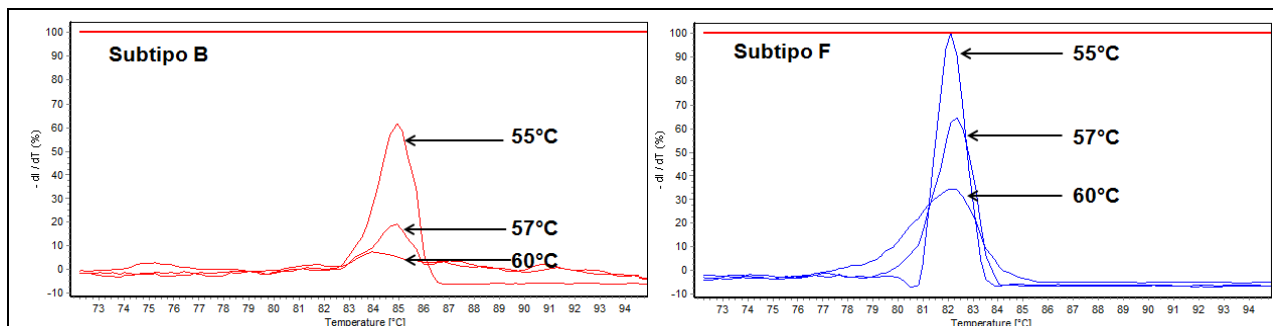


Figura 41. Optimización de la amplificación de GAG_{INT} por qPCR/GAG_{INT}: T_H de los cebadores.

Gráficos de la distribución de la primera derivada de la emisión de fluorescencia vs temperatura para los subtipos B y F. Se utilizaron como plantillas los plásmidos de referencia pNL4-3 (subtipo B) y p93BR020.1 (subtipo F).

Como una de los objetivos era el de obtener curvas de disociación para cada subtipo donde se minimizara el solapamiento de las mismas, se procedió a ensayar diferentes velocidades de rampas de lectura de la señal fluorescente las cuales se muestran en la Figura 42. En base a estos resultados, la rampa de 0,03°C/segundo es la condición que permite definir mejor las T_m para cada subtipo.

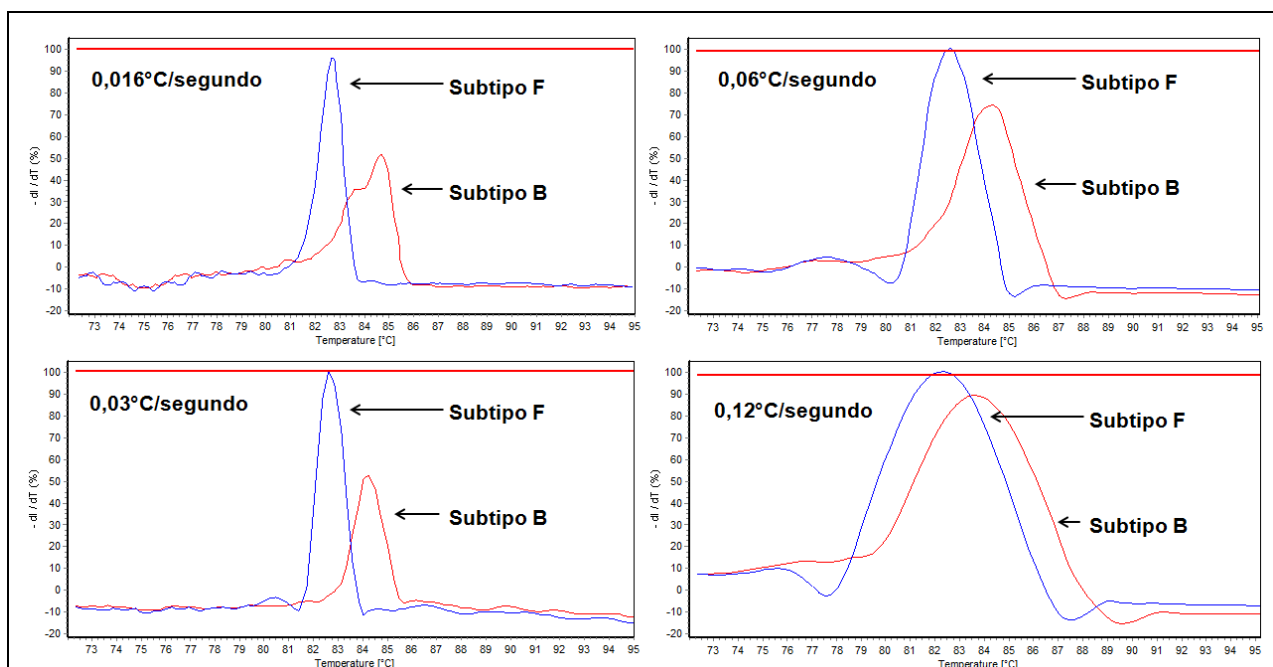


Figura 42. Optimización de la curva de disociación para el ensayo qPCR/GAG_{INT}.

Gráficos de la distribución de la primera derivada de la emisión de fluorescencia vs temperatura para los subtipos B y F. Se utilizaron como plantillas los plásmidos de referencia pNL4-3 (subtipo B) y p93BR020.1 (subtipo F).

4.2.4.2 CARACTERIZACIÓN DE LOS SEGMENTOS EXTERNO E INTERNO DEL GEN *gag*.

4.2.4.2.1 INFERENCIA FILOGENÉTICA DEL SEGMENTO EXTERNO (GAG_{EXT}): DETERMINACIÓN DEL SUBTIPO REAL.

Siguiendo con el algoritmo de trabajo (Tabla 20 – ítem 10, 11 y 12), las bandas de 455 pb correspondientes al segmento GAG_{EXT}, obtenido a partir de las 58 muestras clínicas (34 de PBMC y 24 de plasma), fueron cortadas con bisturí del gel de agarosa, el ADN resultante fue purificado y clonado en el vector pGEM®-T-Easy (Ítem 3.4.5). Los clones correspondientes fueron enviados al servicio de secuenciación de Macrogen (Corea del Sur). El fragmento de interés (GAG_{EXT}) se obtuvo en 51 muestras (27 de PBMC y 24 de plasma) de las 58 que originalmente arrojaron bandas visibles y del tamaño adecuado en el gel de agarosa. Las 51 secuencias obtenidas fueron caracterizadas mediante inferencia bayesiana a fin de conocer el “subtipo real” al cual pertenecían (Tabla 20 – ítem 13). El árbol filogenético obtenido (Figura 43) permitió concluir que 37/51 (72,5%) de las secuencias analizadas estaban relacionadas con el subtipo B (23 de PBMC y 14 de plasma), mientras que 14/51 (27,5%) correspondían al subtipo F/inter-subtipo F1 (4 de PBMC y 10 de plasma). Estos resultados constituyen los subtipos reales de las muestras analizadas en el segmento GAG_{EXT} y se utilizaron como referencia para evaluar la habilidad de la estrategia de tipificación en base a la T_m obtenida por qPCR-MAC para discriminar los subtipos B y F, que se describe a continuación.

4.2.4.2.2 DETERMINACIÓN DE LAS T_m EMPÍRICAS POR qPCR-MCA DE LOS SEGMENTOS INTERNOS (GAG_{INT}).

Una vez determinadas las condiciones óptimas del ensayo qPCR/GAG_{INT} (Tabla 20 – ítem 14), se analizaron los 51 plásmidos conteniendo los fragmentos GAG_{EXT} de las muestras clínicas que pudieron ser clonadas, secuenciadas y caracterizados en subtipos por inferencia filogenética (Tabla 20 – ítems 9-13; Ítem 3.9.2). Para ello, los plásmidos correspondientes fueron amplificados por qPCR, se realizó el MCA y se determinaron las T_m empíricas para cada uno (Tabla 20 – ítems 15-16). Con los valores de T_m obtenidos de las 37 secuencias correspondientes al subtipo B del HIV-1 y del plásmido pNL4-3, se generó una base de datos de T_m empíricas para el subtipo B correspondiente a la región *gag* (Tabla 20 – ítem 17; Tabla 25A). A partir de esa base de datos se calcularon la mediana y el desvío estándar (DS) a fin de definir un rango de valores de T_m (límite inferior y superior) que permitiría identificar a una muestra incógnita como perteneciente al subtipo B (Tabla 20 – ítem 18; Tabla 25B). De forma similar, se procedió con las T_m empíricas provenientes de las 14 secuencias clasificadas como inter-subtipo F1 por filogenia y del plásmido de referencia para ese subtipo.

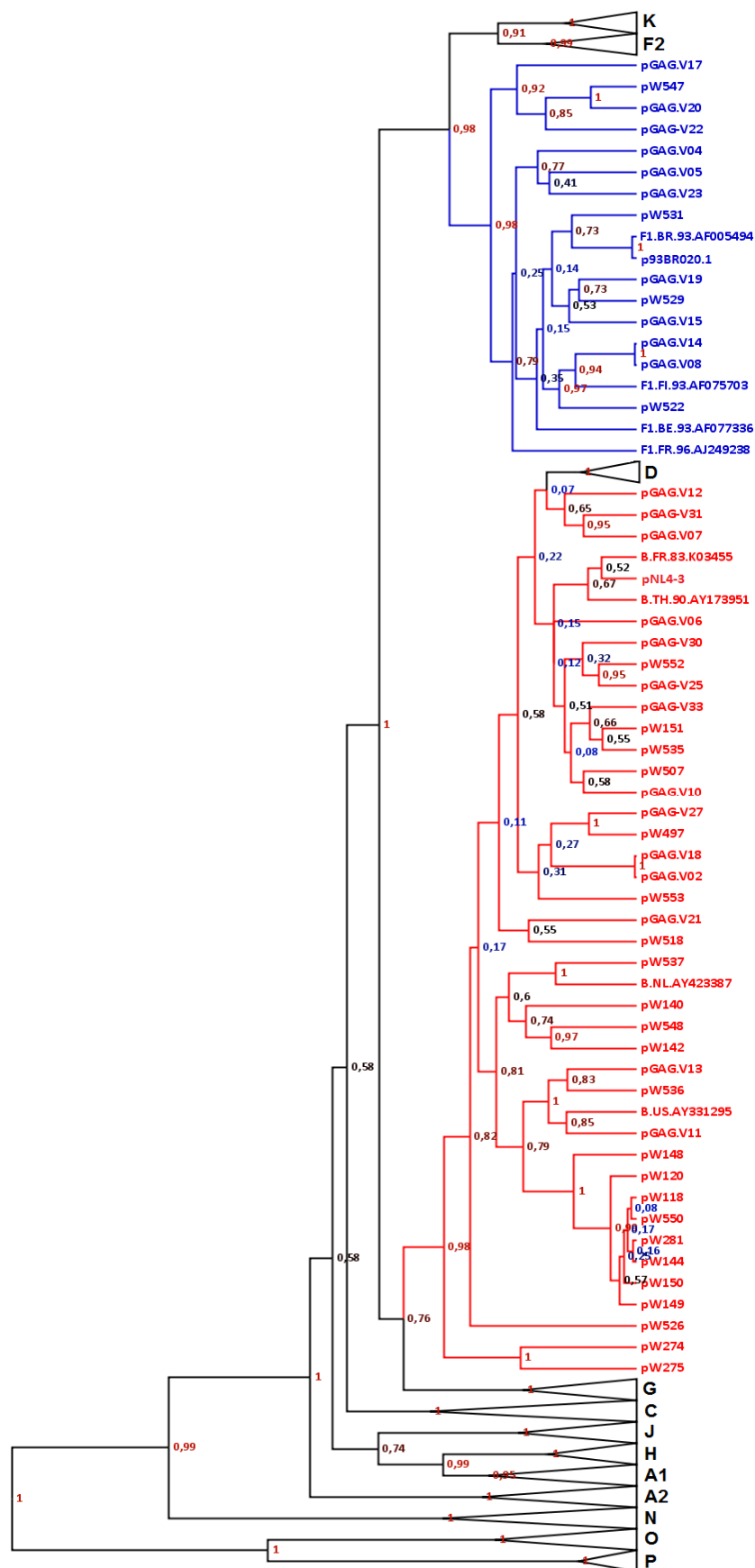


Figura 43. Inferencia bayesiana para los segmentos GAG_{EXT}.
Leyenda en la página siguiente.

Figura 43. Inferencia bayesiana para los segmentos GAG_{EXT}.

El clado correspondiente al subtipo B se muestra en rojo, y el del subtipo F en azul. Se incluyeron las siguientes secuencias de referencia: i) subtipo B: K03455, AY173951, AY423387 y AY331295, ii) inter-subtipo F1: AF005494, AF075703, AF077336 y AJ249238. Las ramas para el resto de los subtipos y grupos fueron colapsados. Se indican los valores de *probabilidad posterior* en cada uno de los nodos (rojo: valores altos; negro: valores medios; azul: valores bajos).

Con respecto al subtipo B (Tabla 25B), el 81% (30/37) de las muestras presentaron valores de T_m dentro del rango definido. Las 7 muestras restantes (pGAG.V02, pGAG.V07, pGAG.V10, pGAG.V18, pGAG.V25, pGAG.V31 y pGAG.V33) arrojaron valores de T_m menores al límite inferior del rango definido para el subtipo B (T_m < 83,36), sin embargo, no localizaron dentro del rango determinado para el subtipo F. Con respecto al subtipo F, el 79% (11/14) de las muestras analizadas presentaron valores de T_m dentro del rango definido.

Tabla 25. Valores de T_m empíricas (A) y rangos de T_m (B) definidos para cada subtipo en la región gag.
Se resaltan aquellas muestras cuyos valores de T_m no están contenidas dentro del rango definido.

A	Subtipo B				Subtipo F	
	Muestra	T_m empírica (°C)	Muestra	T_m empírica (°C)	Muestra	T_m empírica (°C)
	pNL4-3	83,40	pW552	84,00	p93BR020.1	81,84
	pW118	84,30	pW553	83,90	pGAG.V04	82,25
	pW120	83,90	pW507	83,50	pGAG.V05	82,15
	pW140	84,40	pW536	84,90	pGAG.V08	82,28
	pW142	83,90	pW537	84,90	pGAG.V14	81,98
	pW144	83,60	pGAG.V02	82,78	pGAG.V15	81,39
	pW148	84,10	pGAG.V06	84,51	pGAG.V17	82,28
	pW149	84,20	pGAG.V07	82,75	pGAG.V19	81,39
	pW150	84,20	pGAG.V10	83,30	pGAG.V20	82,32
	pW151	83,60	pGAG.V11	83,92	pGAG.V22	82,73
	pW274	83,80	pGAG.V12	83,77	pGAG.V23	82,43
	pW275	84,10	pGAG.V13	84,07	pW522	82,80
	pW281	84,40	pGAG.V18	82,78	pW529	81,30
	pW497	83,50	pGAG.V21	84,13	pW531	81,80
	pW518	84,10	pGAG.V25	83,30	pW547	82,40
	pW526	84,30	pGAG.V27	83,53		
	pW535	83,60	pGAG.V30	83,77		
	pW548	84,00	pGAG.V31	82,75		
	pW550	84,40	pGAG.V33	83,32		

B	N° secuencias	Tm empíricas (°C)				
		Mediana	ΔT_m	DS	Rango	
					Límite Inferior	Límite Superior
Subtipo B	38	83,90	1,65	0,54	83,36	84,44
Subtipo F	15	82,25		0,48	81,77	82,74

Las 3 muestras restantes (pGAG.V15, pGAG.V19 y pW529) presentaron T_m menores al límite inferior del rango ($T_m < 81,77$) y tampoco localizaron dentro del rango determinado para el subtipo B, al igual que lo observado para las muestras de subtipo B con T_m empíricas por fuera del rango definido para ese subtipo.

Analizando los resultados de la Tabla 25B, se puede observar un ΔT_m de $1,65^\circ\text{C}$ entre los rangos de T_m empíricas determinados para ambos subtipos, no observándose superposición entre los rangos de T_m empíricas para el subtipo B ($83,36^\circ\text{C} - 84,44^\circ\text{C}$) y el subtipo F ($81,77^\circ\text{C} - 82,74^\circ\text{C}$). Por lo tanto, podemos concluir que la región analizada del *gag* del HIV-1 es adecuada para discriminar entre los subtipos B y F en base a T_m en las condiciones experimentales establecidas (Tabla 20 – ítem 19).

En base a estos resultados obtenidos, procedimos a la optimización de los ensayos de amplificación para las 2 regiones génicas seleccionadas en la etapa teórica (*vif* y *nef*) siguiendo el algoritmo de trabajo previamente aplicado (Tabla 20).

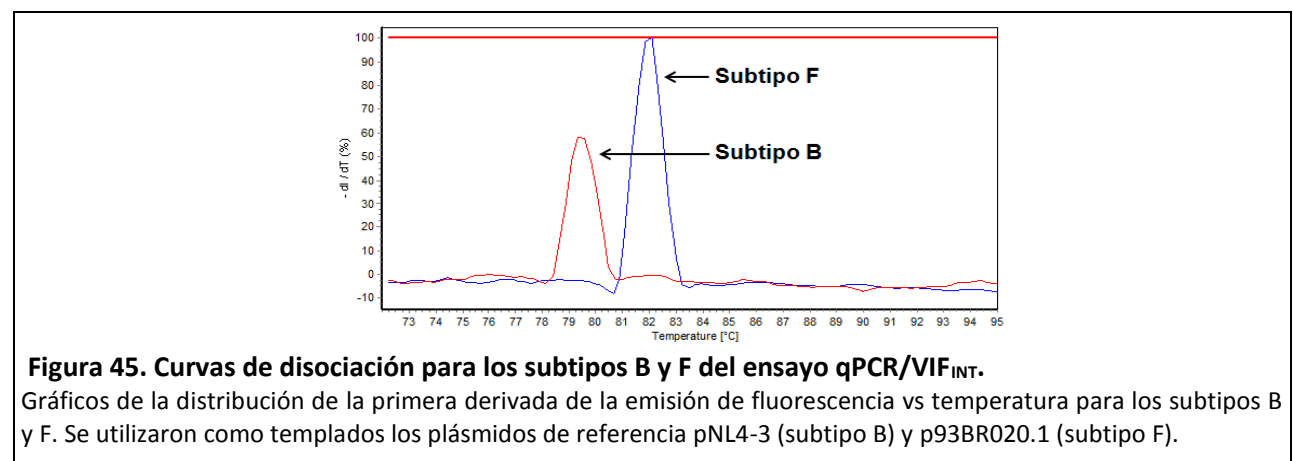
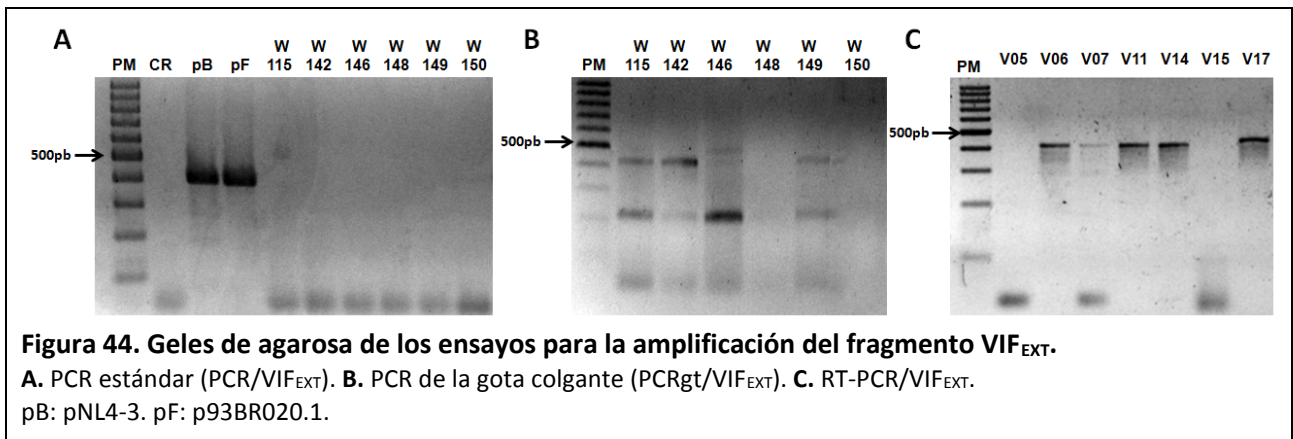
4.2.5 TIPIFICACIÓN DE LA REGION *vif* DEL HIV-1.

4.2.5.1 ENSAYOS PARA LA AMPLIFICACIÓN DE LOS SEGMENTOS EXTERNO (VIF_{EXT}) E INTERNO (VIF_{INT}).

Para la optimización del ensayo PCR/ VIF_{EXT} y PCRgt/ VIF_{EXT} se siguió un procedimiento similar al descrito para el gen *gag* (Ítem 4.2.2.1). Las condiciones óptimas de amplificación para cada uno de los ensayos se detallan en el Ítem 3.8.

El ensayo PCR/ VIF_{EXT} se utilizó para evaluar las 40 muestras de PBMC empleadas anteriormente para la amplificación del segmento externo del gen *gag* (GAG_{EXT}), a partir de las cuales no se pudo obtener producto amplificado del tamaño deseado (425 pb). Debido a esto, la totalidad de las muestras fue analizada utilizando la técnica de “PCR de la gota colgante” (PCRgt/ VIF_{EXT}) con el objetivo de aumentar la sensibilidad analítica en la detección del ADN proviral. Mediante este ensayo se obtuvo producto amplificado en 5/40 (12,5%) de las muestras. Posteriormente, se analizaron las 25 muestras de plasma de individuos HIV-positivos (HIV+) por medio del ensayo RT-PCR/ VIF_{EXT} , pudiéndose obtener resultados positivos en 12/25 (48%) de ellas, no observándose bandas inespecíficas. A modo de ejemplo, la Figura 44 muestra las corridas electroforéticas para algunas de las muestras analizadas con los distintos ensayos.

En paralelo, se optimizó el qPCR/VIF_{INT}, siguiendo el mismo procedimiento que el descrito para GAG_{INT} y teniendo en cuenta el criterio definido en el Ítem 4.2.2.1.2. La Figura 45 muestra las curvas de disociación obtenidas para los subtipos B y F en las condiciones óptimas para los cebadores VIF-F2/VIF301 (ensayo de qPCR/VIF_{INT}) que se detallan en el Ítem 3.8.



4.2.5.2 CARACTERIZACIÓN DE LA REGIÓN *vif*: DETERMINACIÓN DEL SUBTIPO REAL POR FILOGENIA (VIF_{EXT}) Y DE LA TM EMPÍRICA (VIF_{INT}).

Las bandas de 425 pb correspondientes al segmento VIF_{EXT}, obtenidas previamente a partir de las 17 muestras clínicas (5 de PBMC y 12 de plasma), fueron cortadas del gel de agarosa, el ADN fue purificado y posteriormente clonado en el vector pGEM®-T-Easy (Tabla 20 – ítems 9-10). Del total de muestras, solo se pudo clonar el fragmento VIF_{EXT} correspondiente de 12 muestras de plasma. Los plásmidos obtenidos se cuantificaron por medida de absorbancia y se enviaron al servicio de secuenciación (Tabla 20 – ítem 11). Las secuencias obtenidas fueron caracterizadas mediante inferencia bayesiana a fin de conocer el “subtipo real” (Tabla 20 – ítems 12-13) y el árbol filogenético obtenido se muestra en la Figura 46.

De acuerdo a la inferencia bayesiana de la región *vif* se puede concluir que 8/12 (67%) de las muestras estudiadas correspondían al subtipo B, y 4/12 (23%) pertenecían al inter-subtipo F1.

Sucesivamente, se determinaron las T_m empíricas de los 12 plásmidos conteniendo los fragmentos VIF_{EXT} que pudieron ser secuenciados y caracterizados en subtipos por inferencia filogenética. Para ello, los plásmidos correspondientes fueron amplificados por qPCR, se realizó el MCA y se determinaron las T_m para cada uno (Tabla 20 – ítems 15-16). Como descripto para la región *gag*, con los valores de T_m obtenidos de las 8 secuencias correspondientes al subtipo B del HIV-1, de las 4 secuencias correspondientes al inter-subtipo F1, y de los plásmidos de referencia, se generaron las bases de datos de T_m empíricas para cada subtipo correspondiente a la región *vif* (Tabla 20 – ítem 17; Tabla 26A), se calcularon la mediana y el DS para cada grupo de datos a fin de determinar el rango de valores de T_m empíricas para cada subtipo (límite inferior y superior) que permitiría identificar a una muestra incógnita como perteneciente a subtipo B o F1 (Tabla 20 – ítem 18; Tabla 26B).

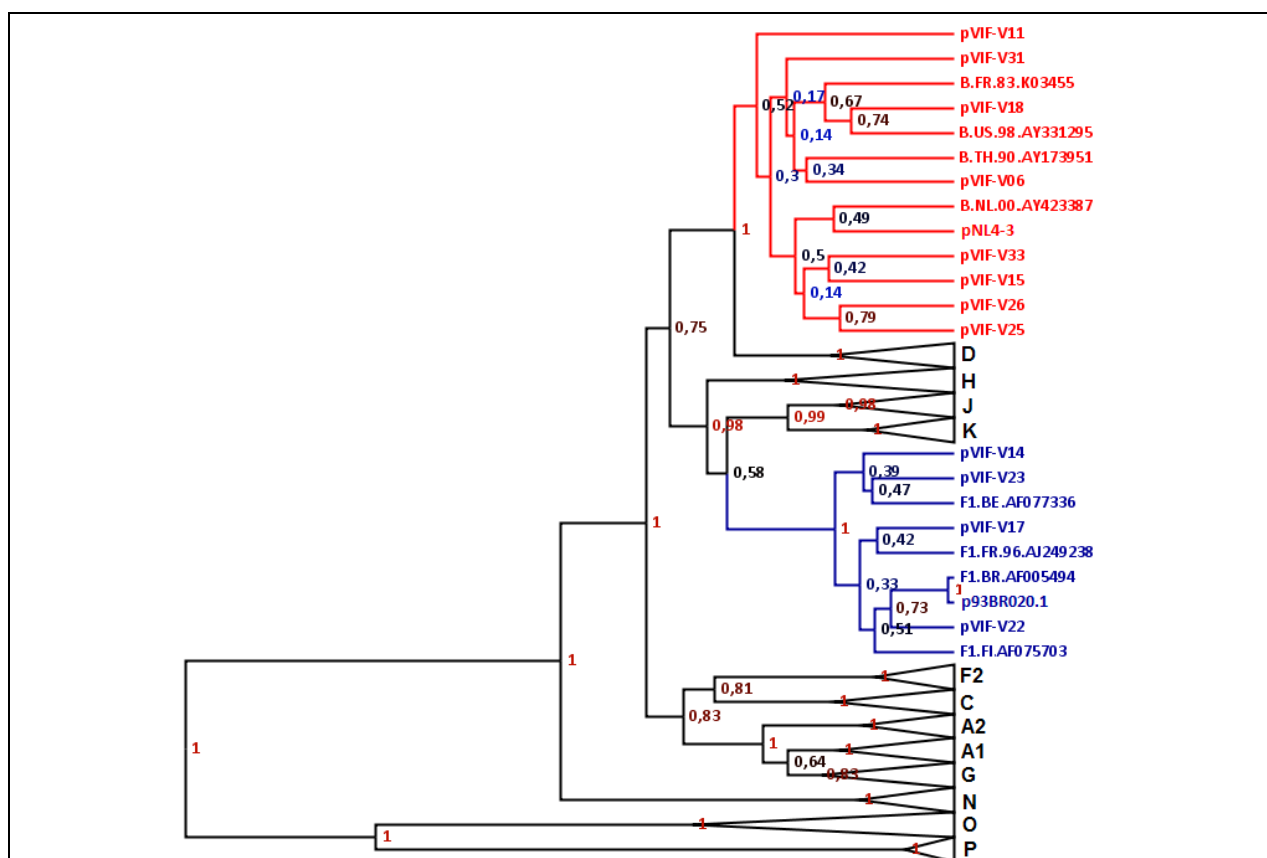


Figura 46. Inferencia bayesiana para los fragmentos VIF_{EXT}.

El clado correspondiente al subtipo B se muestra en rojo, y el del subtipo F en azul. Se incluyeron las siguientes secuencias de referencia: i) subtipo B: K03455, AY173951, AY423387 y AY331295, ii) inter-subtipo F1: AF005494, AF075703, AF077336 y AJ249238. Las ramas para el resto de los subtipos y grupos fueron colapsadas. Se indican los valores de la probabilidad *posterior* en cada uno de los nodos (rojo: valores altos; negro: valores medios; azul: valores bajos).

Con respecto al subtipo B, 6/8 (75%) de las muestras presentaron valores de T_m dentro del rango definido, mientras que 2 muestras, pVIF-V15 (T_m = 79,30°C) y pVIF-V25 (T_m = 81,24°C), arrojaron valores de T_m por fuera del rango definido para el subtipo B (79,45°C-80,65°C), sin embargo, no localizaron dentro del rango determinado para el subtipo F (Tabla 26). Con respecto al subtipo F, el 75% (3/4) de las

muestras presentaron valores de T_m dentro del rango definido, mientras que la muestra pVIF-V22 ($T_m = 82,43^\circ\text{C}$) tuvo una T_m mayor al límite inferior del rango definido para el subtipo F ($T_m > 82,28^\circ\text{C}$) aunque tampoco localizó dentro del rango del subtipo B (Tabla 26).

Analizando los resultados de la Tabla 26B, se puede observar un ΔT_m de $1,94^\circ\text{C}$ entre los rangos de T_m empíricas determinados para ambos subtipos, no observándose superposición entre los rangos de T_m empíricas para el subtipo B ($79,45^\circ\text{C} - 80,65^\circ\text{C}$) y el subtipo F ($81,69^\circ\text{C} - 82,28^\circ\text{C}$). Por lo tanto, podemos concluir que la región analizada del *vif* del HIV-1 es adecuada para discriminar entre los subtipos B y F en base a T_m en las condiciones experimentales establecidas (Tabla 20 – ítem 19).

Tabla 26. Valores de T_m empíricas (A) y rangos de T_m (B) definidos para cada subtipo en la región *vif*.
Se resaltan aquellas muestras cuyos valores de T_m salen del rango definido.

A	Subtipo B		Subtipo F	
	Muestra	T_m empírica ($^\circ\text{C}$)	Muestra	T_m empírica ($^\circ\text{C}$)
	pNL4-3	79,75	p93BR020.1	82,14
	pVIF-V06	80,64	pVIF-V14	81,90
	pVIF-V11	79,90	pVIF-V17	81,69
	pVIF-V15	79,30	pVIF-V22	82,43
	pVIF-V18	80,79	pVIF-V23	81,99
	pVIF-V25	81,24		
	pVIF-V26	80,35		
	pVIF-V31	80,05		
	pVIF-V33	79,90		

B	N° secuencias	T_m empíricas ($^\circ\text{C}$)				
		Mediana	ΔT_m	DS	Rango	
					Límite Inferior	Límite Superior
Subtipo B	9	80,05	1,94	0,60	79,45	80,65
Subtipo F	5	81,99		0,29	81,69	82,28

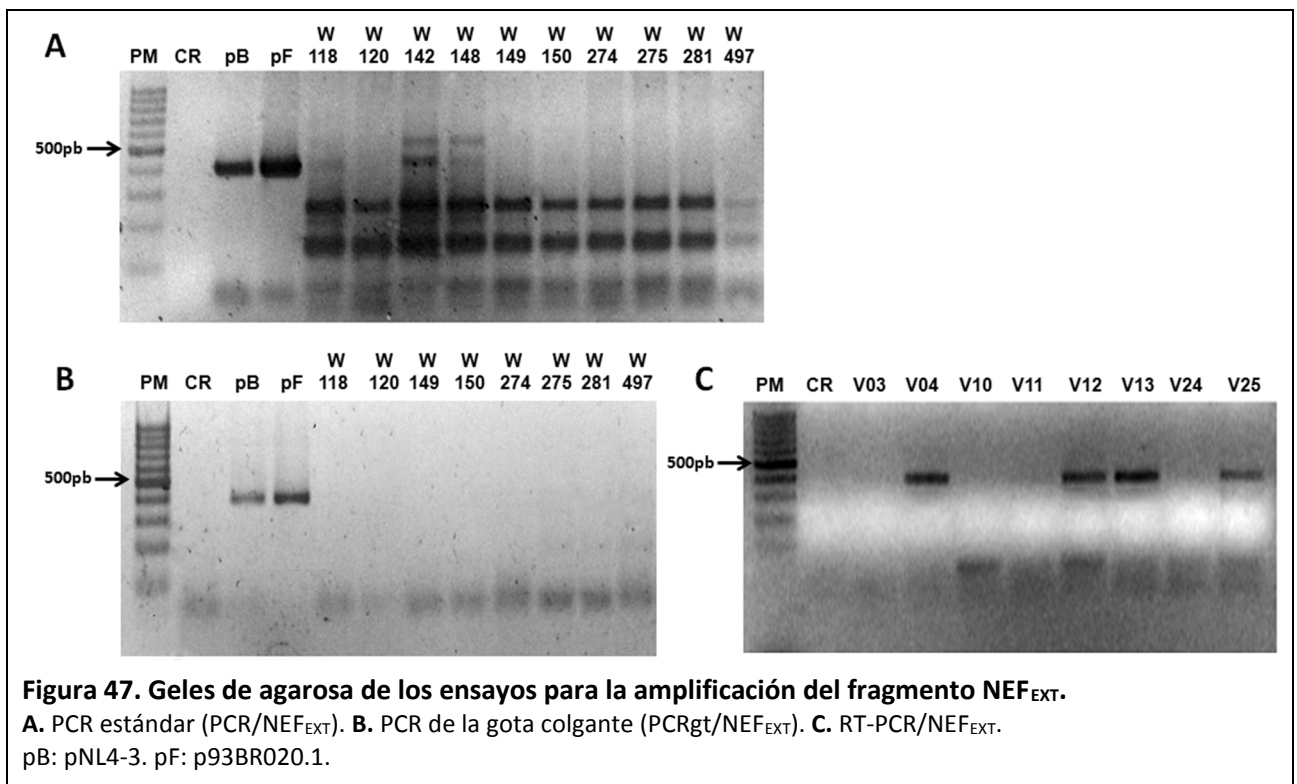
4.2.6 TIPIFICACIÓN DE LA REGION *nef* DEL HIV-1.

4.2.6.1 ENSAYOS PARA LA AMPLIFICACIÓN DE LOS SEGMENTOS EXTERNO (NEF_{EXT}) E INTERNO (NEF_{INT}).

Para la optimización del ensayo PCR/ NEF_{EXT} y PCRgt/ NEF_{EXT} se siguió un procedimiento similar al descrito para el gen *gag* (Ítem 4.2.2.1). Las condiciones óptimas de amplificación para cada uno de los

ensayos se detallan en el ítem 3.8.

El ensayo PCR/NEF_{EXT} se utilizó para evaluar las 40 muestras de PBMC empleadas anteriormente para la amplificación de los segmentos externos correspondientes a las regiones de los genes *gag* (GAG_{EXT}) y *vif* (VIF_{EXT}), a partir de las cuales solo se pudo obtener producto amplificado del tamaño deseado (391 pb) en 5/40 (12,5%) de las muestras, obteniéndose además un gran número de bandas inespecíficas. Debido a esto, las 36 muestras restantes se analizaron utilizando la técnica de “PCR de la gota colgante” (PCRgt/NEF_{EXT}) para aumentar la sensibilidad analítica en la detección del ADN proviral. Sin embargo, con el ensayo PCRgt/NEF_{EXT} no se logró amplificar ninguna de la 36 muestras analizadas. Finalmente, se ensayaron las 25 muestras de plasma de individuos HIV-positivos (HIV+) con el ensayo RT-PCR/NEF_{EXT}, obteniéndose bandas visibles del tamaño adecuado en 20/25 (80%) de las muestras. A modo de ejemplo, la Figura 47 muestra las corridas electroforéticas para algunas de las muestras analizadas con los distintos ensayos.



En paralelo, se optimizó el ensayo qPCR/NEF_{INT} siguiendo los mismos lineamientos utilizados para los ensayos qPCR/GAG_{INT} y qPCR/VIF_{INT}. La Figura 48 muestra las curvas de disociación obtenidas para los subtipos B y F en las condiciones óptimas para los cebadores NEF-F2/NEF-R1 (ensayo qPCR/NEF_{INT}) que se detallan en el ítem 3.8.

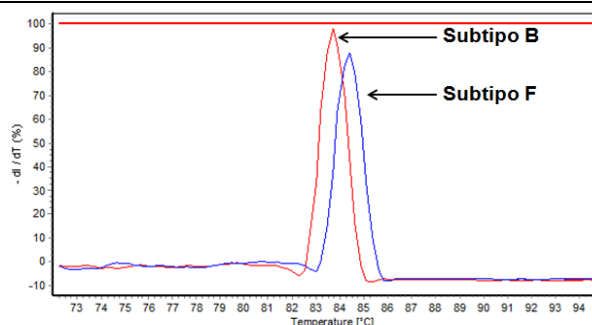


Figura 48. Curvas de disociación para los subtipos B y F del ensayo qPCR/NEF_{INT}.

Gráficos de la distribución de la primera derivada de la emisión de fluorescencia vs temperatura para los subtipos B y F. Se utilizaron como plantillas los plásmidos de referencia pNL4-3 (subtipo B) y p93BR020.1 (subtipo F).

4.2.6.2 CARACTERIZACIÓN DE LA REGIÓN *nef*: DETERMINACIÓN DEL SUBTIPO REAL POR FILOGENIA (NEF_{EXT}) Y DE LA T_m EMPÍRICA (NEF_{INT}).

Las bandas de 391 pb correspondientes al segmento NEF_{EXT}, obtenidas previamente a partir de las 25 muestras clínicas (5 de PBMC y 20 de plasma), fueron procesadas como fue descrito (Ítem 4.2.4.1). Del total de muestras, se pudo clonar el fragmento NEF_{EXT} correspondiente en 20 muestras de plasma, los cuales fueron secuenciados en el servicio de secuenciación (Tabla 20 – ítem 11)). Las secuencias obtenidas fueron caracterizadas mediante inferencia bayesiana a fin de conocer el “subtipo real” (Tabla 20 – ítems 12-13) y el árbol filogenético obtenido se muestra en la Figura 49. De acuerdo a la inferencia bayesiana de la región *nef* se puede concluir que 9/20 (45%) de las muestras estudiadas correspondían al subtipo B y 11/20 (55%) pertenecían al inter-subtipo F1.

Finalmente, se determinaron las T_m empíricas de los 20 plásmidos conteniendo los fragmentos NEF_{EXT} que pudieron ser secuenciados y caracterizados en subtipos por inferencia filogenética. Para ello, los plásmidos correspondientes fueron amplificados por qPCR, se realizó el MCA y se determinaron las T_m para cada uno (Tabla 20 – ítems 15-16). Se procedió como descrito para las regiones *gag* y *vif*: se generaron las bases de datos de T_m empíricas para cada subtipo correspondiente a la región *nef* (Tabla 20 – ítem 17; Tabla 27A), y se calcularon la mediana y el DS para cada grupo de datos a fin de determinar el rango de valores de T_m empíricas para cada subtipo (Tabla 20 – ítem 18; Tabla 27B).

Analizando los resultados de la Tabla 27B, se puede observar un ΔT_m de 0,07°C entre los rangos de T_m empíricas determinados para ambos subtipos, y que el rango de T_m empíricas para el subtipo B (83,73°C – 84,56°C) se superpone con el rango obtenido para el subtipo F (83,86°C – 84,58°C). Por lo tanto, podemos concluir que la región analizada del *nef* del HIV-1 no cumple con el criterio establecido (Tabla 20 – ítem 19) para discriminar entre los subtipos B y F en base a T_m.

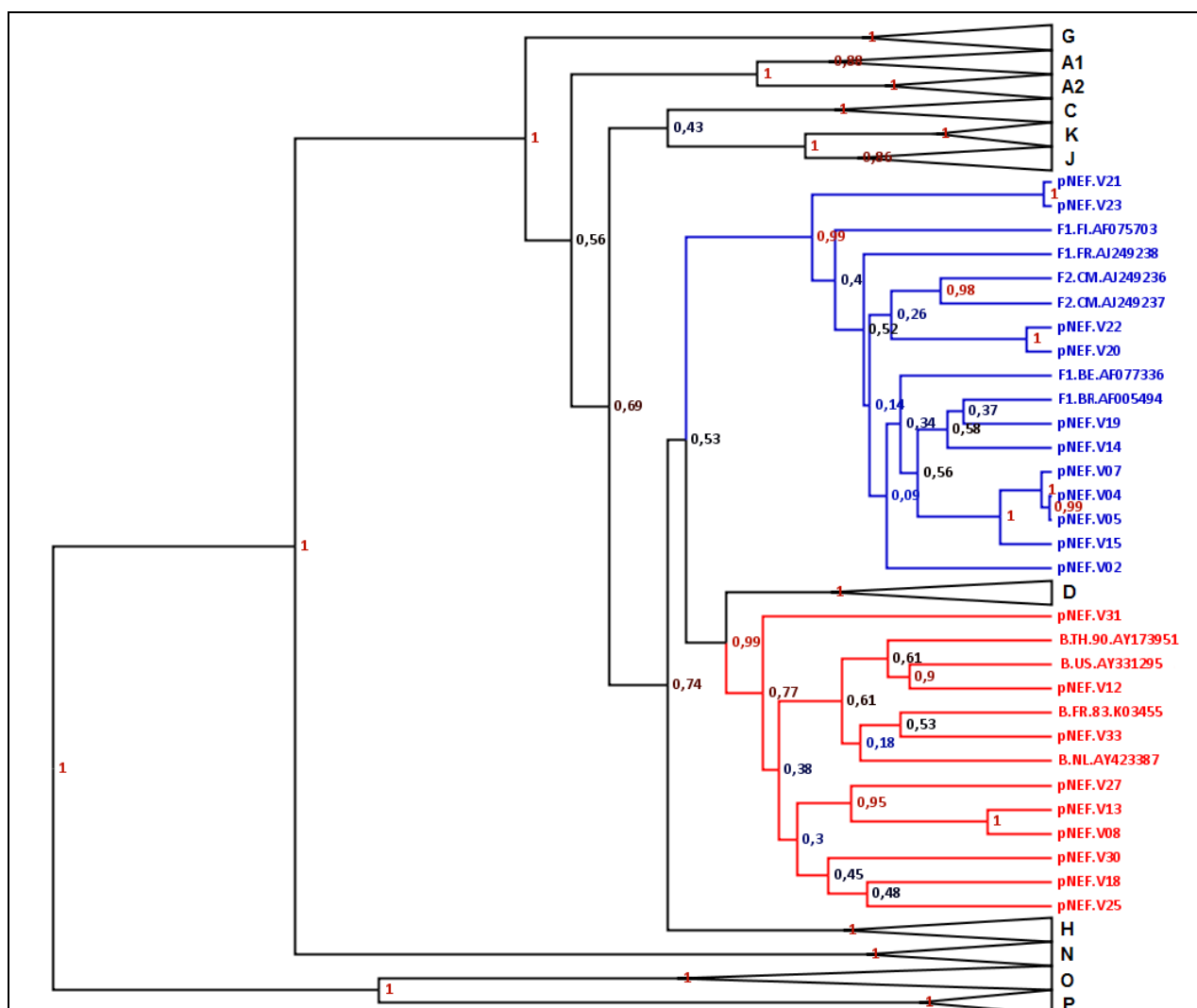


Figura 49. Inferencia bayesiana para los fragmentos NEF_{EXT}.

El clado correspondiente al subtipo B se muestra en rojo, y el del subtipo F en azul. Se incluyeron las siguientes secuencias de referencia: i) subtipo B: K03455, AY173951, AY423387 y AY331295, ii) inter-subtipo F1: AF005494, AF075703, AF077336 y AJ249238. Las ramas para el resto de los subtipos y grupos fueron colapsados. No se consideraron las cepas de referencia F2.AY371158 y D.AY371157 por estar incompletas sus secuencias en el segmento estudiado. Se indican los valores de la *probabilidad posterior* en cada uno de los nodos (rojo: valores altos; negro: valores medios; azul: valores bajos).

Tabla 27. Valores de Tm empíricas (A) y rangos de Tm (B) definidos para cada subtipo en la región *nef*.
Se resaltan aquellas muestras cuyos valores de Tm salen del rango definido.

A	Subtipo B		Subtipo F	
	Muestra	Tm empírica (°C)	Muestra	Tm empírica (°C)
	pNL4-3	83,90	p93BR020.1	84,25
	pNEF-V08	84,07	pNEF-V02	84,22
	pNEF-V12	83,92	pNEF-V04	84,07
	pNEF-V13	84,37	pNEF-V05	83,48
	pNEF-V18	84,07	pNEF-V07	83,33
	pNEF-V25	84,22	pNEF-V14	84,22
	pNEF-V27	84,52	pNEF-V15	84,37
	pNEF-V30	84,52	pNEF-V19	84,37
	pNEF-V31	84,97	pNEF-V20	83,92
	pNEF-V33	83,48	pNEF-V21	84,37
			pNEF-V22	84,37
			pNEF-V23	84,37

B	N° secuencias	Tm empíricas (°C)				
		Mediana	ΔTm	DS	Rango	
					Límite Inferior	Límite Superior
Subtipo B	9	84,15	0,07	0,41	83,73	84,56
Subtipo F	11	84,22		0,36	83,86	84,58

4.2.7 ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS DE LA ESTRATEGIA DE TIPIFICACIÓN EN BASE A Tm.

A continuación se resumen las actividades llevadas a cabo para evaluar si la estrategia de tipificación en base a la Tm obtenida por qPCR y MAC permitía discriminar los subtipos B y F en distintas regiones del HIV-1.

- 1- Selección de regiones dentro del genoma del HIV-1 donde se producen la mayoría de los puntos de recombinación de acuerdo a las CRF de referencia (Figura 30). Con este análisis se identificaron 5 potenciales regiones en el genoma de HIV-1: *gag*, *pol*, *vif*, *env*, *nef*.
- 2- Análisis *in silico* para identificar aquellas regiones que podían ser discriminadas por Tm (ítem 4.2.3.2) y que contenían suficiente información filogenética para discriminar entre los subtipos B y F del HIV-1.

Este análisis permitió seleccionar 3 regiones que cumplieran con los criterios establecidos (ítem 4.2.3.3): *gag*, *vif*, *nef*.

3- Análisis empírico para disponer de un número discreto de muestras de genotipo conocido por filogenia en la región seleccionada a fin de generar una base de datos con las Tm obtenidas por qPCR y MAC, y definir el rango empírico de variación de Tm para los subtipos B y F en cada región (ítem 4.2.4). Esta etapa permitió validar 2 regiones para discriminar a los subtipos B y F por Tm de acuerdo al criterio establecido (Tabla 20 – ítem 19): *gag*, *vif*.

En la Figura 50 se resumen los resultados obtenidos en forma teórica y empírica para las regiones *gag*, *vif* y *nef*. El procedimiento abordado a través de la determinación de las Tm teóricas (Tabla 20 – ítem 2-3; ítem 4.2.3.2), fue eficaz para 2 de las 3 regiones identificadas. Específicamente, falló en la región *nef* en la cual se obtuvo una superposición en los rangos de Tm empíricas entre los subtipos B y F a pesar de haber sido la región que arrojó el mayor ΔTm teórico (1,45°C) de las 5 analizadas (Tabla 22). No obstante, el cálculo de las Tm teóricas fue de utilidad para descartar aquellas regiones (*pol*, *env*) que no cumplieran con los criterios establecidos *a priori* (Tabla 20 – ítem 3) y permitió acotar el análisis experimental a las que sí cumplieran (*gag*, *vif*, *nef*).

Sucesivamente, el análisis experimental permitió validar las regiones *gag* y *vif* para tipificar los subtipos B y F en base a Tm (Tabla 20 – ítem 19). Si bien en ambas regiones hubo muestras caracterizadas filogenéticamente que arrojaron valores de Tm por fuera del rango de Tm empíricas definido para el subtipo correspondiente [*gag*: 10/51 (20%); *vif*: 3/12 (25%)], ninguna de ellas localizó en el rango definido para el otro subtipo. Sería necesario analizar un mayor número de muestras clínicas por filogenia y Tm a fin de incrementar la base de datos de Tm empíricas por subtipo para cada región genómica validada y, por lo tanto, delimitar los rangos de Tm empíricas correspondientes con mayor precisión.

Las muestras de plasma fueron las más efectivas para obtener amplificaciones con bandas evidenciables en las regiones validadas. En efecto, la tipificación por Tm está pensada para ser aplicada en formato qRT-PCR en la misma muestra de plasma en la que se realiza el diagnóstico de la infección por HIV-1. De esta manera, el análisis de las regiones *gag* y *vif* por qRT-PCR de la muestra del paciente con posterior determinación de la Tm por MAC permitiría definir el/los subtipo/s correspondiente/s a fin de caracterizar la cepa involucrada en la primoinfección. No obstante, para lograr esta instancia experimental en muestras incógnitas es necesario obtener rangos más precisos en cada región y por subtipo, como mencionado previamente.

Finalmente, se analizaron los resultados obtenidos en las 11 muestras que pudieron ser tipificadas en las 2 regiones validadas. Como puede observarse en la Tabla 28, 10 de ellas arrojaron el mismo subtipo en *gag* y en *vif* (6 B/B y 4 F/F), por lo que no fue posible asignarles un subtipo o CRF específico. Sin embargo, la información resultante de la tipificación en este grupo de muestras permite descartar los subtipos y las CRFs que no estarían involucrados en la infección. Interesantemente, la muestra V15 fue

tipificada como intersubtipo F1 en la región *gag* y como subtipo B en la *vif*, patrón que no corresponde a ninguna de las CRFs descritas (Figura 30).

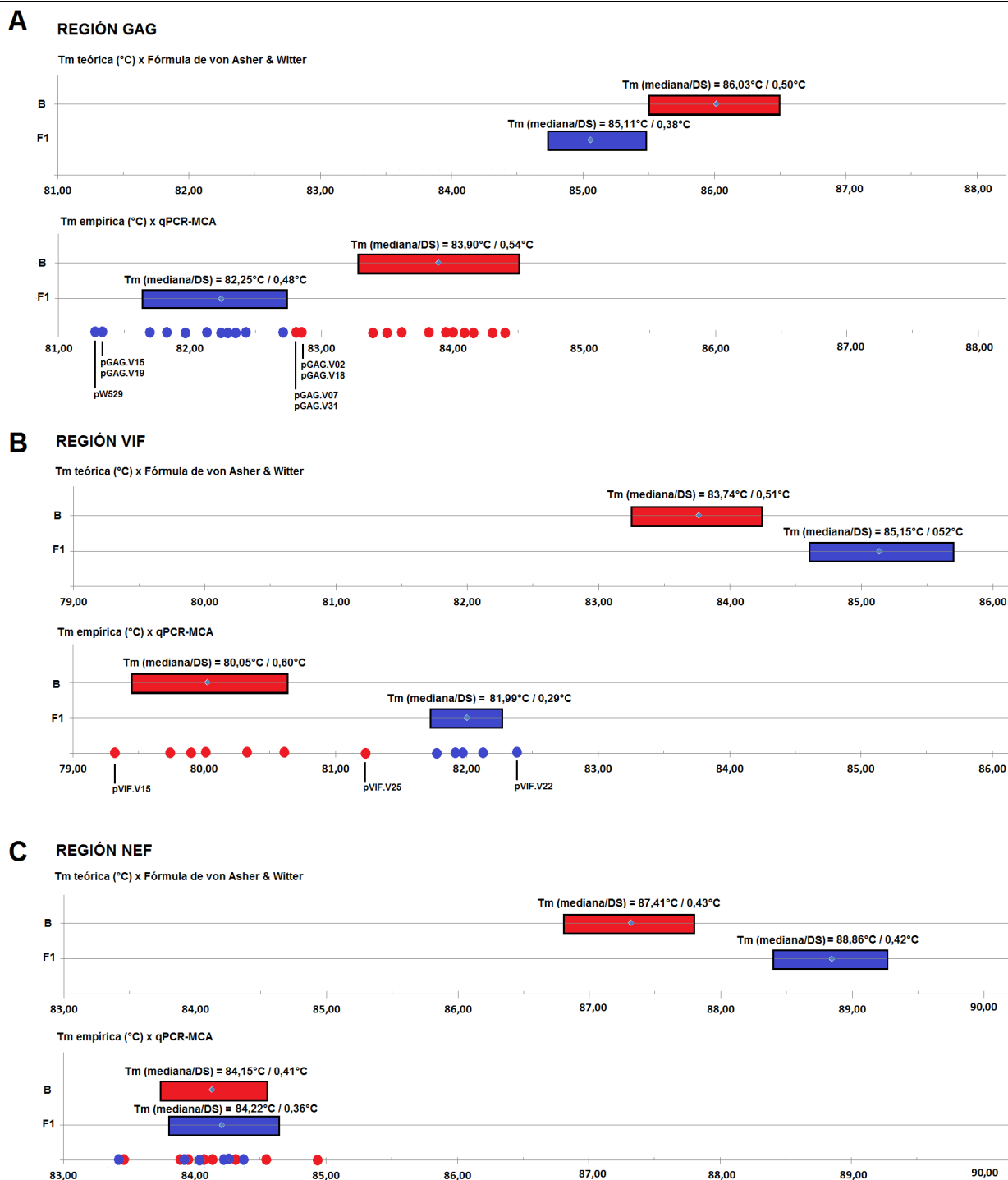


Figura 50. Diagrama de los rangos de Tm (mediana±DS) obtenidos de forma teórica (fórmula de von Asher & Witter) y empírica (qPCR-MCA) para las regiones GAG (A), VIF (B) y NEF (C) del HIV-1.

Los círculos rojos (subtipo B) y azules (subtipos F1) corresponden a los valores de Tm obtenidos de forma empírica a partir de los cuales se determinaron el rango. Se detallan aquellas muestras no comprendidas dentro de los rangos definidos.

Tabla 28: Tipificación de las muestras analizadas en las 2 regiones validadas.

Código Muestra	Región <i>gag</i>		Región <i>vif</i>		Posibles subtipos o recombinantes de HIV-1
	Filogenia	Tm	Filogenia	Tm	
V06	B	B	B	B	Subtipo B puro CRF_28BF CRF_39BF CRF_40BF
V11	B	B	B	B	
V18	B	NT	B	B	
V25	B	NT	B	NT	
V31	B	NT	B	B	
V33	B	NT	B	B	
V15	F	NT	B	NT	URF / nueva CRF?
V14	F	F	F	F	Subtipo F puro CRF_12BF CRF_17BF CRF_38BF CRF_44BF CRF_46BF
V17	F	F	F	F	
V22	F	NT	F	F	
V23	F	F	F	F	

NT: no tipificado por arrojar valor de Tm fuera del rango definido.

Para profundizar este hallazgo, las secuencias correspondientes a los segmentos GAG_{EXT} y VIF_{EXT} de la muestra V15 se analizaron por inferencia filogenética utilizando el alineamiento de 130 secuencias conteniendo los subtipos que circulan en la región empleado en el ítem 4.2.3.1. El análisis del segmento GAG_{EXT} de V15 (Figura 51) revela una relación evolutiva con la variante F1.BR.06.FJ771008, la cual fue aislada de un individuo adulto de San Pablo (Brasil) [203]. Esta variante brasileña pertenece al clado Sudamericano de variantes F1 y la evidencia indica que provendría de una posible recombinación intra-subtipo entre cepas pertenecientes al clado Sudamericano (por ejemplo: F1.AR.02.DQ189088 y F1.BR.07.FJ771010) y el Africano (por ejemplo: F1.FR.96.AJ249238 y F1.ES.x.DQ979024) de F1 [203]. Con respecto al segmento VIF_{EXT} de la muestra V15 (Figura 52), el análisis filogenético indica una relación evolutiva con las cepas B.BR.03.EF637048 y B.BR.02.JN692443, ambas variantes aisladas de individuos de la comunidad de hombres que tienen sexo con hombres de San Pablo (Brasil) [204, 205]. Si bien la tipificación de la región *nef* por Tm no fue factible, la muestra V15 fue clasificada dentro del subtipo F1 por filogenia (Figura 49), presentando entonces un patrón F (*gag*) – B (*vif*) – F (*nef*). Estos datos sugerirían que la muestra V15 podría contener una posible recombinante con origen evolutivo en las cepas circulantes en San Pablo que es el epicentro de la epidemia en Brasil. Sin embargo, es necesario realizar la secuenciación completa de su genoma para confirmar este hallazgo.

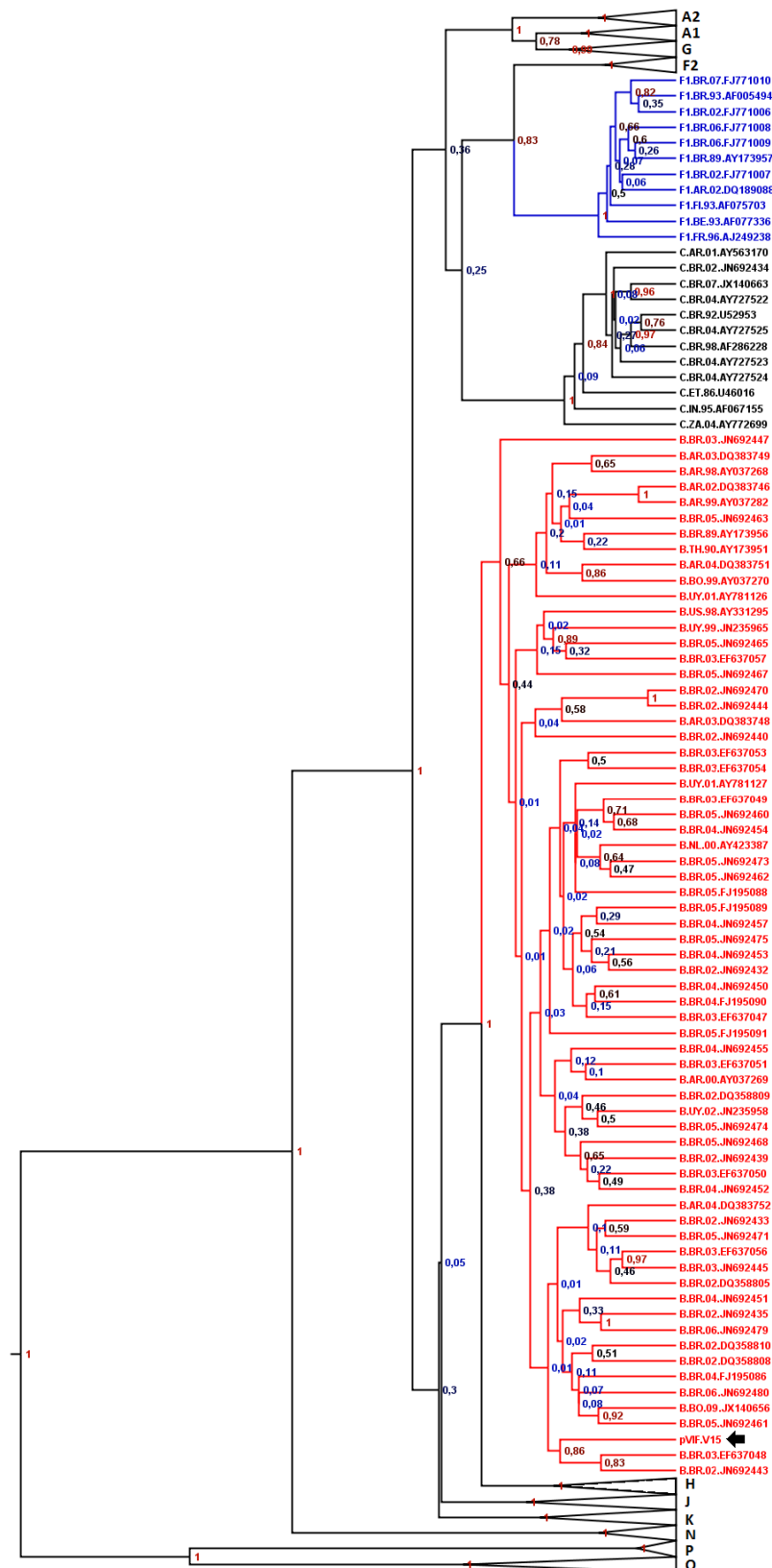


Figura 51. Inferencia bayesiana para el segmento GAG_{EXT} de la muestra V15.

El clado correspondiente al subtipo B se muestra en rojo, el del intersubtipo F1 en azul y el subtipo C en negro. Las ramas para el resto de los subtipos y grupos fueron colapsados. Se indican los valores de la *probabilidad posterior* en cada uno de los nodos (rojo: valores altos; negro: valores medios; azul: valores bajos). Se marca con una flecha la muestra V15.

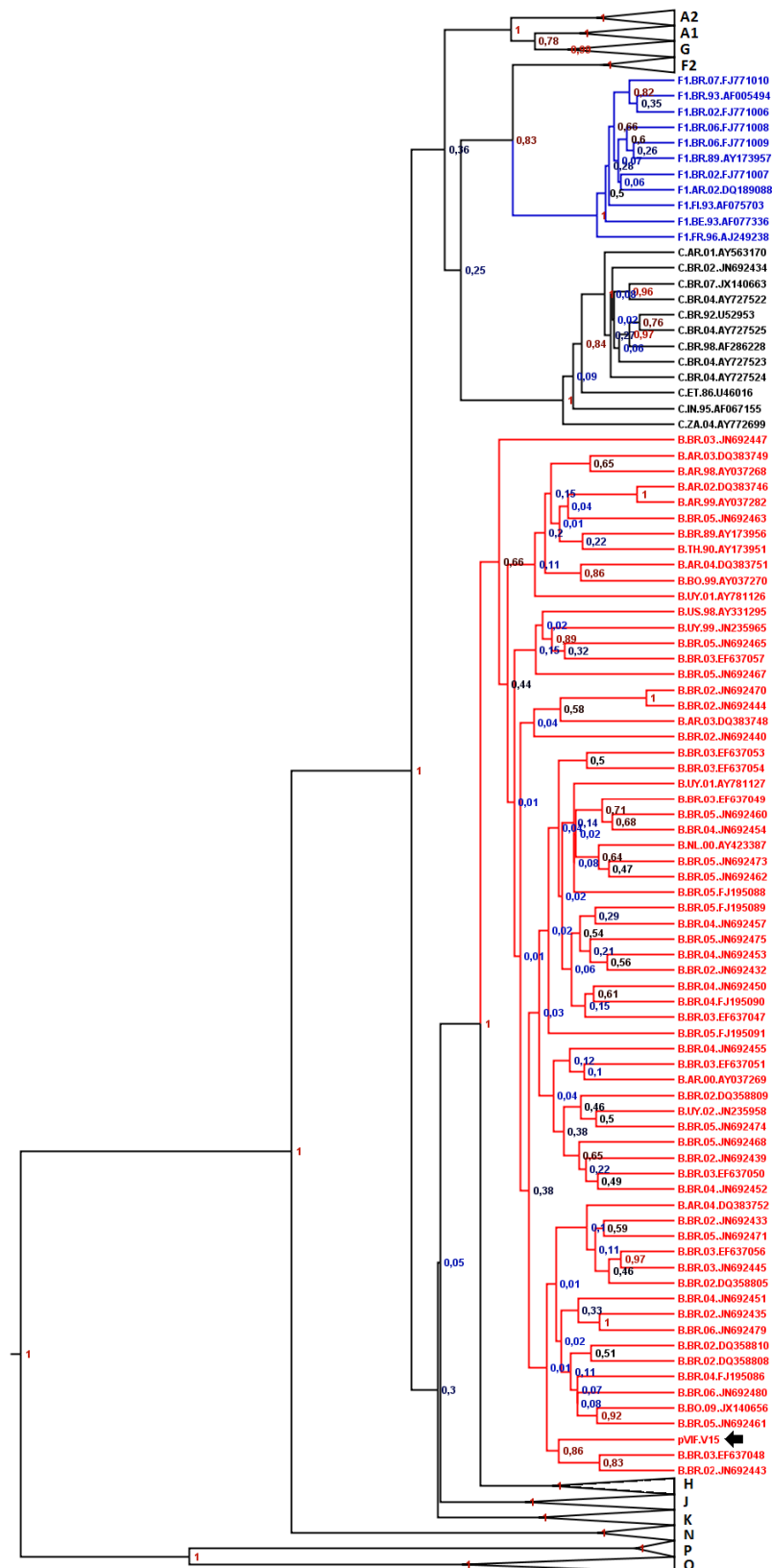
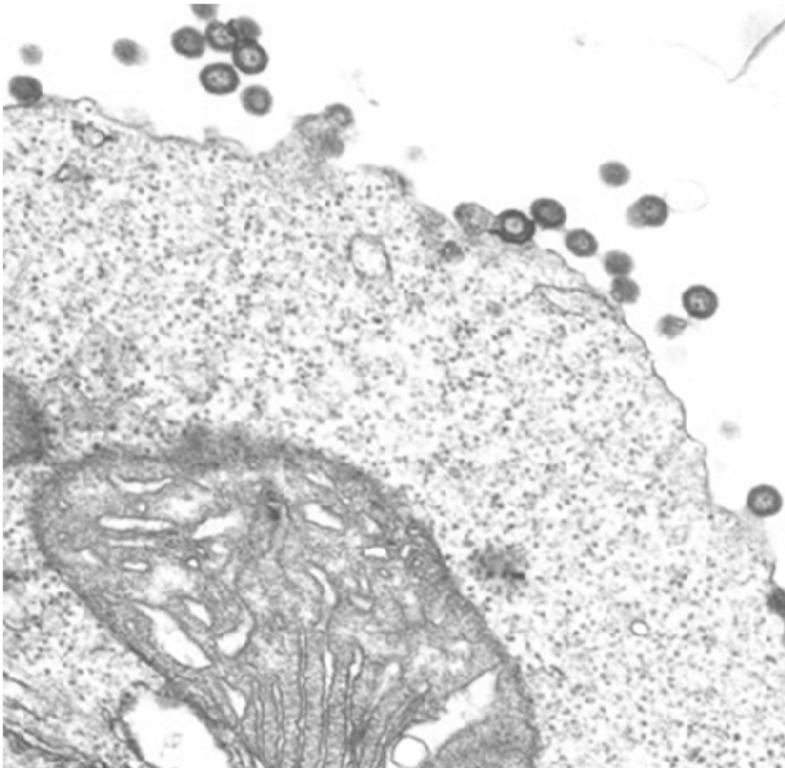


Figura 52. Inferencia bayesiana para el segmento VIF_{EXT} de la muestra V15.

El clado correspondiente al subtipo B se muestra en rojo, el del intersubtipo F1 en azul y el subtipo C en negro. Las ramas para el resto de los subtipos y grupos fueron colapsados. Se indican los valores de la *probabilidad posterior* en cada uno de los nodos (rojo: valores altos; negro: valores medios; azul: valores bajos). Se marca con una flecha la muestra V15.

5. DISCUSIÓN



En el 2012 se cumplieron tres décadas del primer diagnóstico de SIDA en Argentina. Durante este período, tanto la dinámica de la epidemia como las respuestas preventivas y asistenciales atravesaron diversas etapas [127]. Sin embargo, la disminución de los riesgos de las infecciones virales transmisibles por transfusión y la posibilidad de garantizar una provisión de sangre adecuada con calidad óptima siguen siendo los pilares fundamentales para alcanzar una mejor prestación en salud [206].

En los años posteriores al inicio de la epidemia del HIV/SIDA, se implementaron diversas medidas para aumentar la seguridad transfusional, que han permitido reducir la transmisión de infecciones por transfusión en los países desarrollados [206], con un riesgo residual de infección por el HIV de 1:2.000.000 de donaciones [207, 208]. No obstante, estos resultados no pueden extrapolarse a nuestra realidad transfusional, donde la mayoría de los donantes son de reposición, es decir, la persona dona sangre condicionada por el centro hospitalario, solo con la finalidad de suplir las necesidades de sangre o reponer la utilización de ésta en los pacientes. Además, el carácter no altruista de la donación hace que el producto sea menos seguro, lo cual se evidencia por las mayores prevalencias de los marcadores para diversas infecciones en donantes de reposición cuando se las compara con las de los donantes voluntarios [206].

Con el fin de eliminar este riesgo, las normativas nacionales como internacionales sumaron tres estrategias: *i)* tratar los componentes con métodos de inactivación para eliminar los probables agentes infecciosos (solo aplicable al plasma), *ii)* implementar políticas para la captación de donaciones voluntarias altruistas (medidas pre-analíticas), e *iii)* incorporar métodos de mayor sensibilidad para la detección de estas infecciones en PVS. El desarrollo e implementación de ensayos NAT para el tamizaje de los donantes de BS permitió reducir el tiempo de detección de la infección por HIV (es decir, el PVS) a 14 días, con la correspondiente disminución del riesgo residual de infección (Ítem 1.10). A pesar de este avance, se han documentado diversos casos en donde la dinámica poblacional del HIV-1 (Ítem 1.8) ha afectado la sensibilidad metodológica de las técnicas de diagnóstico, ya que la mayoría de los ensayos comerciales están específicamente diseñados sobre la base de la secuencia nucleotídica del subtipo B del HIV-1, de mayor prevalencia en los países desarrollados (Ítem 1.9.3). La introducción de variantes no-B o la circulación estable de formas recombinantes, como la CRF12_BF o diversas URF_BF en Argentina (Figura 10), otorgan características particulares a la epidemia en cada región geográfica (Figura 11). Estos hechos deben ser tenidos en cuenta al momento de implementar un sistema NAT en el tamizaje de donantes, a fin de poder disponer de nuevos sistemas de detección que hayan sido diseñados en base a la realidad epidemiológica regional (Ítem 1.9.3).

Desde que se estableció la trascendencia de la detección del ARN y del ADN proviral de HIV-1 como biomarcadores para el diagnóstico temprano de la infección por HIV-1, las nuevas tecnologías de biología molecular disponibles fueron adecuándose para este propósito. La RT-PCR es la metodología más empleada para la detección de ARN virales presentes en muestras biológicas en muy bajas cantidades,

permitiendo así el estudio molecular de la mayor parte de las infecciones tempranas y persistentes. A pesar de las múltiples ventajas de esta metodología, su utilidad como ensayo diagnóstico se ve afectada ante la eventual presencia de sustancias inhibidoras de la reacción de amplificación en las muestras clínicas (por ejemplo: heparina, hemoglobina, etc.). Estos inhibidores pueden afectar tanto la sensibilidad analítica como la sensibilidad diagnóstica del ensayo, incluso cuando están presentes en pequeñas cantidades [209], arrojando resultados falsamente negativos [210, 211], aún en muestras acelulares como el suero o plasma [212]. Además de los inhibidores de la RT-PCR potencialmente presentes en las muestras utilizadas, existen otras sustancias que pueden ser añadidas durante el procesamiento de la muestra (por ejemplo: detergentes iónicos, solventes orgánicos, etc.) y que afectan la eficiencia de la reacción [213]. Para minimizar la presencia de posibles inhibidores en la mezcla de reacción, en este trabajo de tesis se utilizaron solo métodos comerciales para la obtención de los ARN basados en la extracción en fase sólida, compuestos de una matriz de intercambio reversible de aniones empaquetada en columnas de polipropileno (Ítem 3.4.2) a fin de obtener una rápida y eficiente purificación de los ácidos nucleicos [214]. No obstante, los ensayos moleculares diseñados para detectar la infección por HIV-1 con fines diagnósticos requieren de controles de calidad que permitan verificar la presencia de inhibidores en cada muestra.

En base a estas consideraciones, en este trabajo de tesis se ha diseñado una herramienta diagnóstica para la detección temprana del HIV-1 con la incorporación de un CIC específico que se amplifica simultáneamente con la secuencia *target* en el mismo tubo de reacción (Ítem 1.10.2). La ausencia simultánea de productos amplificados del CIC y del HIV-1 indica que la muestra contiene inhibidores, y el resultado queda invalidado. Esta característica permite el control de calidad de los resultados, requisito esencial para la aplicación del ensayo en el diagnóstico de la infección por HIV-1 y en el tamizaje molecular de donantes de sangre (Ítem 4.1.1).

La variación genética del HIV-1 constituye un desafío para el diseño de ensayos moleculares. La detección del virus puede verse comprometida por los polimorfismos naturales con respecto a las secuencias de los cebadores y sondas utilizadas. De esta forma, variantes genéticamente divergentes pueden pasar desapercibidas, ya que, por lo general, la información sobre la secuencia no se conoce en el momento de la prueba. Considerando estos aspectos, se desarrolló y optimizó un nuevo sistema de cebadores que hibridan con zonas conservadas de la región *gag* del HIV-1, en concordancia con la empleada por la mayoría de los laboratorios biotecnológicos (Tabla 7). Se utilizaron todas las secuencias correspondientes a los distintos subtipos, CRFs y URFs del HIV-1 reportadas en las bases de datos de referencia, se seleccionaron 2 sistemas de cebadores que amplifican un fragmento de aproximadamente 132 pb (Anexo 3):

i) **cebadores ALL** (ALL-Fw/ALL-Rv) destinado a cubrir el espectro de cepas circulantes a nivel global y se incluyó en su diseño la introducción de generaciones nucleotídicas en las posiciones de mayor variabilidad,

ii) **cebadores SUD** (SUD-F1/SUD-R1) diseñados en base a las secuencias informadas para los subtipos y CRFs circulantes a nivel regional, sin degeneraciones en su secuencia y priorizando el mínimo número de bases desapareadas (*mismatch*).

En el análisis comparativo de los cebadores sentidos (ALL-Fw y SUD-F1) y los antisentidos (ALL-Rv y SUD-R1) con respecto a todos los subtipos y CRFs de referencia del HIV-1, se puede observar que en ambos casos habría idéntica especificidad de hibridación, en idénticas condiciones, con la mayoría de las secuencias de referencia utilizadas para el estudio (Anexo 4A – Tabla 8). Resultados similares se obtienen cuando se utiliza la base de datos compuesta por las secuencias de las cepas aisladas en la región (Argentina, Brasil, Uruguay, Bolivia y Chile): para los cebadores sentido, el 80% (114/180) de las secuencias no presentan diferencias entre sí en el número de *mismatch*, mientras que para los cebadores antisentido, este valor se incrementa al 92% (166/180) (Anexo 4B – Tabla 9).

Para la detección de los productos amplificados por ambos sistemas de cebadores se diseñó la sonda **S-Gagp24** con el objetivo de aumentar la especificidad del ensayo y la sensibilidad mediante detección colorimétrica con un formato de EIA. Para su diseño se consideró la incorporación de degeneraciones al igual que en los cebadores ALL (Anexo 3). Del análisis del número de *mismatch* de S-Gagp24 con respecto a las secuencias de HIV-1 alineadas se observa que, para los subtipos y CRFs de referencia, el 83% (131/158) de las secuencias no presentan *mismatch* con la sonda, mientras que para las variantes aisladas en la región el porcentaje se incrementa al 91% (163/180) (Anexo 4A y B).

Los sistemas de amplificación PCR/ALL y PCR/SUD fueron optimizados con los plásmidos de referencia (pNL4-3 y p93BR020.1) (Ítems 4.1.3.1 y 4.1.3.2). El desempeño de ambos ensayos en evaluación fue comparado con el sistema de referencia compuesto por los cebadores SK (SK145 y SKCC1B) (Anexo 3), los cuales amplifican una región del gen *gag* del HIV-1 que se solapa con el fragmento amplificado por los sistemas en estudio (Figura 16) y están incluidos en el ensayo comercial COBAS® Amplicor HIV-1 Monitor. Todos los cebadores en estudio fueron capaces de detectar hasta 50 copias de los plásmidos conteniendo los subtipos B y F, ya sea en forma pura como combinada (Tabla 14). Sin embargo, la capacidad de detección en muestras clínicas derivadas de PBMC no resultó igualmente eficiente en todos los sistemas. Solo el ensayo PCR/SUD mostró una concordancia del 100% con el diagnóstico de infección en las muestras analizadas, pudiéndose detectar el 87,5% de las muestras con el sistema PCR/SK y solo el 62,5% con el ensayo PCR/ALL (Tabla 15). Estos resultados ponen de manifiesto la complejidad de los desarrollos biotecnológicos con fines diagnósticos y fueron decisivos para definir el sistema de cebadores a emplear en la construcción del CIC.

Como mencionamos anteriormente (Ítem 1.10.2), los seudo-fagos se han utilizado con éxito para preparar CIC de ARN resistentes a nucleasas para ensayos de RT-PCR [146, 215]. Sin embargo, estos reactivos están disponibles comercialmente para pocos de virus con genoma de ARN, estando su utilización limitada a secuencias dianas específicas y definidas por el fabricante. Por lo tanto, existe una necesidad inmediata de contar con una estrategia simple y directa para la construcción de CIC aplicables a ensayos de RT-PCR de diversas especies [216]. Teniendo en cuenta estas consideraciones, en este trabajo se ha presentado el desarrollo de un CIC para ser utilizado en un método de detección temprana del HIV-1. Para ello, se empleó la estrategia de construcción y producción de CIC derivada del bacteriófago Q β , desarrollada en nuestro laboratorio, y aplicada con éxito en un ensayo para la detección cualitativa del ARN del HCV (RT-PCR-HCV/CIC_{HCV}) [154] (Ítem 1.10.3).

Es importante destacar que la estrategia elegida permite disponer de un sistema regulable de obtención de partículas fágicas, lo cual permitiría evaluar el número de partículas que deberían ser adicionadas a la muestra según los protocolos de estandarización de cada ensayo (Ítem 4.1.6). La utilización de la cepa de *E.coli* BL21 (DE3)/pLys S permitió una expresión controlada e inducible del genoma del fago Q β clonado como ADNc bajo control del promotor T7 (Figura 18).

Para que las partículas fágicas Q β _{SK} y Q β _{SUD} puedan ser utilizadas como CICs en los ensayos de RT-PCR correspondientes, era necesario corroborar que solo contenían el ARN modificado encapsidado y libre del ADN plasmídico utilizado para la transformación (pBRT7Q β _{SK} o pBRT7Q β _{SUD}) que pudiera interferir en la interpretación de los resultados. Los resultados obtenidos luego de los tratamientos con DNAasa y ARNasa mostraron que: *i*) el ADN plasmídico había sido eliminado, *ii*) los ARN de los fagos Q β _{SK} y Q β _{SUD} estaban encapsidados, y *iii*) la amplificación era específica para cada fago recombinante (Tabla 17, Ítem 4.1.8). Por lo cual, podemos concluir que los lisados obtenidos de Q β _{SK} y Q β _{SUD} contienen ARN recombinante amplificable sin ADN plasmídico contaminante.

Cuando se evaluó la estabilidad de las suspensiones de Q β _{SK} y Q β _{SUD} recombinantes a 4°C mediante RT-PCR, los valores de DO se mantuvieron estables para ambos fagos recombinantes por al menos 24 meses (Figura 27, Ítem 4.1.9). Por lo cual, había sido posible aislar fagos recombinantes, resistentes a ARNasas, que podían ser amplificados con los cebadores SUD o SK, y estables a 4°C para poder ser mantenidos en la heladera por largos periodos de tiempo. Esto permitió concluir que los Q β _{SK} y Q β _{SUD} podían ser utilizados como CICs, ya que cumplen con los requisitos necesarios para ser incorporados a ensayos moleculares con fines diagnósticos (Ítem 1.10.2).

Los ensayos de infectividad mostraron que los fagos Q β _{SUD} y Q β _{SK} eran capaces de producir placas de lisis pero en un número muy bajo (1×10^2 UFP/ml para ambos) y de manera no reproducible con respecto a la cepa salvaje (1×10^9 UFP/ml) (Figura 26, Ítem 4.1.8). Los bajos títulos de los fagos Q β _{SUD} o Q β _{SK} que se obtuvieron en relación al fago salvaje (Figura 26) y la incapacidad de no poder ser aglutinados por el PEG-

8000 para su concentración (Tabla 16), eran indicativos que las modificaciones realizadas en las secuencias nucleotídicas para obtener $Q\beta_{SUD}$ y $Q\beta_{SK}$ afectaron las secuencias aminoacídicas de las proteínas A1 recombinantes respectivas y, por lo tanto, sus estructuras secundarias y terciarias. Si bien los fagos $Q\beta_{SUD}$ o $Q\beta_{SK}$ se formaban, los resultados indicaban que eran defectivos para la infección, ya sea por haberse afectado la interacción de la partícula fágica con el pili de la bacteria aceptora (*E. coli* XL1BlueF'), o por haberse alterado el acoplamiento entre la proteína A1 y la replicasa provocando la disminución de la síntesis de la enzima, alterando la biología del fago desde su replicación hasta su encapsidación. Para probar esta última hipótesis, sería necesario realizar experimentos que evalúen la actividad de las replicasas salvaje y recombinante para cada uno de los constructos, actividades que están fuera de los objetivos de este trabajo de tesis.

Durante la segunda mitad del siglo XX, el bacteriófago $Q\beta_{WT}$ fue una de las herramientas moleculares más atractivas para estudios de replicación vírica y expresión de ARN. Experimentos utilizando este virus permitieron determinar que: *i)* las tasas de error durante la replicación del fago alcanzaban valores 100.000 veces mayores que los estimados para la replicación de células y virus de ADN [217], y *ii)* las poblaciones de fago eran genéticamente heterogéneas constituyendo una *cuasiespecie* viral [218, 219], de forma similar al HIV-1 (Ítem 1.8.1). Teniendo en cuenta esto y considerando que los fagos $Q\beta_{SUD}$ y $Q\beta_{SK}$ pudieron ser amplificados por los ensayos RT-PCR/SUD y RT-PCR/SK, respectivamente, podríamos hipotetizar la existencia de una población mixta de fagos en el lisado, donde una proporción de ellos habría revertido o modificado su genoma de manera tal de aumentar su eficiencia infectiva y otra fracción correspondería a los fagos recombinantes defectivos para la infección. Esto podría producirse por un mecanismo de reversión al azar, reportado para fagos con genoma ARN en el cual se han realizado inserciones en regiones del genoma que no codifican para proteínas con función vital como la replicasa. A través de este mecanismo, los fagos intentan recomponer la estabilidad en el plegamiento de su genoma [220]. Así, con las 2 metodologías utilizadas para el análisis de los lisados de los fagos recombinantes podríamos estar observando las dos poblaciones mencionadas anteriormente: *i)* a través de la titulación se evidenciarían solo los fagos infectivos que podrían haber modificado su genoma, y *ii)* a través de la RT-PCR, se amplificarían los fagos recombinantes defectivos para la infección. No obstante, para avalar esta hipótesis se deberían analizar las secuencias de los fagos que se obtienen a partir de las placas de lisis y determinar si hay presencia de fagos que han modificado su genoma por los mecanismos antes mencionados para lograr una mayor eficiencia en su replicación, o bien si se trata de fagos recombinantes con menor eficiencia de infección.

Como se mencionó anteriormente (Ítem 4.1.10), la descripción reciente de la estructura tridimensional de la proteína A1 de $Q\beta_{WT}$ (Figura 28), nos permitió hacer un análisis más exhaustivo del impacto que provocó la sustitución de las secuencias fágicas por las secuencias heterólogas en $Q\beta_{SUD}$ y $Q\beta_{SK}$, correspondientes a los cebadores SUD y SK, respectivamente, y compararlos con el $Q\beta_{HCV}$

desarrollado previamente [154]. Es importante destacar que cuando se planteó el diseño de los megacebadores A1-Bst98_{SUD}/A1-Nsi_{SUD} y A1-Bst98_{SK}/A1-Nsi_{SK} (Ítem 4.1.6) no se disponía de la estructura cristalográfica de la proteína A1. Por lo cual, el diseño fue realizado basándose exclusivamente en las secuencias nucleotídicas disponibles en la base de datos. Hoy sabemos que la región C-terminal de A1, donde se han reemplazado secuencias para obtener los fagos recombinantes Q β _{SUD}, Q β _{SK} y Q β _{HCV}, está relativamente conservada, sugiriendo que esta parte del dominio es la más crítica para la funcionalidad de la proteína [183]. Si bien el reemplazo de las secuencias fágicas por las heterólogas en Q β _{SUD} y Q β _{SK} no redujo el tamaño de la proteína A1 de forma tan drástica como en Q β _{HCV}, sí se alteraron diversos motivos estructurales en el extremo C-terminal (Figura 29), lo que podría explicar los resultados obtenidos: i) perturbación del dominio funcional de la proteína A1 (capacidad infectiva disminuida), y ii) cambio de su carga superficial por la incorporación de AA ácidos o polares no cargados (incapacidad de unión al PEG-8000 a través de enlaces electrostáticos). En el futuro, se debería considerar la estructura de la proteína A1 al momento de construir fagos recombinantes para alterar lo menos posible las estructuras secundarias (por ejemplo, hoja- β 8, α 4-hélice y hoja- β 10; Figura 28) o introduciendo codones de *stop* para obtener proteínas A1 recombinantes más cortas (por ejemplo, proteína A1 de Q β _{HCV}; Figura 29). Sin embargo, en esta instancia, debemos considerar el propósito por el cual fueron construidos los fagos recombinantes Q β _{SUD} y Q β _{SK}, que es el de ser utilizados como CICs en ensayos moleculares de detección temprana del HIV-1 (Figura 13). Para ello, la cantidad requerida de CICs a ser adicionada a la muestra de plasma, previo a la extracción de ARN, es mínima (10 - 50 copias/ml), por lo que las modificaciones realizadas en las secuencias de la proteína A1 salvaje no afectarán la función específica para la cual fueron desarrollados en este trabajo de tesis.

Dado que la epidemia es dinámica y la diversidad genética del HIV-1 evoluciona rápidamente, las evaluaciones de todos ensayos moleculares, con licencia comercial y de formato *in-house*, deberían realizarse regularmente en poblaciones locales de pacientes infectados. Por ello, antes de incorporar el fago recombinante Q β _{SUD} como CIC_{SUD} en el ensayo RT-PCR/SUD, se verificó que el sistema desarrollado con los cebadores seleccionados fuera capaz de detectar todos los subtipos del grupo M, así como las variantes del grupo N y grupo O del HIV-1 (Tabla 18). Posteriormente, se realizaron los ensayos de optimización teniendo en cuenta que las únicas condiciones que se podían modificar eran aquellas que afectaban al proceso de detección, ya que las variables correspondientes a la retrotranscripción y amplificación estaban previamente establecidas y estandarizadas para la detección del HIV-1 (Ítem 4.1.3.2). Esto era de suma importancia ya que no se quería afectar la sensibilidad y especificidad del método desarrollado, si no que el objetivo era adicionar el CIC_{SUD} al ensayo para dar confiabilidad a los resultados que se obtuvieran sin afectar el diagnóstico de la infección por HIV-1. Por otra parte, si bien los lisados poseían partículas fágicas infectivas, la posible presencia de partículas defectivas hace imposible

cuantificar el CIC_{SUD} con los ensayos de infección y titulación, como fue planteado anteriormente en esta discusión. Debido a esto, la cantidad de $Q\beta_{SUD}$ a adicionar a la muestra para que la competencia en la reacción por los cebadores no inhiba la amplificación del virus *target* (HIV-1), deberá ser determinada empíricamente para cada nuevo lote de lisado de $Q\beta_{SUD}$ obtenido.

Luego pudimos verificar satisfactoriamente el empleo del CIC_{SUD} en el ensayo RT-PCR/SUD para la detección de HIV-1 en individuos de la región. Este experimento fue realizado de manera preliminar utilizando muestras de plasma HIV-positivas con diferentes CV, obteniéndose resultados alentadores (Ítem 4.1.11), ya que: *i*) la co-amplificación de ambos genomas virales fue posible sin inhibición, pudiéndose detectar cada uno de forma específica con las sondas correspondientes, *ii*) el ensayo desarrollado en este trabajo doctoral (RT-PCR/SUD/ CIC_{SUD}) mostró un desempeño similar al ensayo de referencia (RT-PCR/SK/ CIC_{SK}), y la utilidad de los CICs como controles de calidad del procedimiento completo se evidenció en la muestra HIV-negativa (Tabla 19). Sin embargo, es imprescindible analizar el desempeño del ensayo RT-PCR/SUD/ CIC_{SUD} con un número elevado de muestras con diferentes viremias para evaluar de una manera estadísticamente significativa la cantidad correcta de CIC_{SUD} a utilizar, permitiendo demostrar el beneficio práctico del sistema propuesto. Dejamos planteada la necesidad de analizar la variación en la amplificación del CIC_{SUD} en presencia y ausencia de posibles inhibidores en distintas muestras de plasma (hemolizadas, hiperbilirrubineicas, lipémicas, etc) a fin de asegurar la eficiencia del ensayo.

Los datos obtenidos con el ensayo RT-PCR/SUD/ CIC_{SUD} indican que es factible la detección de al menos 185 copias/reacción de ARN del HIV-1 (Tabla 18). Sin embargo, es necesario determinar la sensibilidad analítica del ensayo RT-PCR/SUD/ CIC_{SUD} mediante el análisis de progresión *probit* utilizando el estándar internacional de HIV-1 del NIBSC, como fue descripto para el ensayo de detección de HCV (RT-PCR-HCV/ CIC_{HCV}) (Ítem 1.10.3). Los estándares preparados en el NIBSC son los recomendados por los organismos de referencia para determinar la sensibilidad analítica de un test de detección del ARN de HIV-1, ya sea para uso diagnóstico y/o como herramienta NAT, y son provistos en forma de liofilizado por lo que su integridad no se ve afectada durante el transporte desde el Reino Unido y eventual estadía en la Aduana Argentina. Un hecho que incidió negativamente en el abordaje de este objetivo fue que este reactivo (*2nd HIV-1 RNA International Standard*, código 97/650) estaba agotado en el NIBSC durante la etapa experimental correspondiente. Por lo tanto, queda pendiente la determinación de la sensibilidad analítica del ensayo RT-PCR/SUD/ CIC_{SUD} , la cual se podrá llevar a cabo con el nuevo estándar internacional de HIV-1 (*3rd HIV-1 International Standard*, código 10/152) que ya se encuentra disponible en el NIBSC.

Por otro lado, es necesario considerar que los límites de detección para los ensayos RT-PCR/SUD/ CIC_{SUD} y RT-PCR-HCV/ CIC_{HCV} fueron obtenidos a partir de un volumen de 150 μ l de plasma, cuando los ensayos NAT comerciales utilizan un volumen de 1 ml de plasma para la extracción de ARN viral, es decir, un volumen casi 7 veces mayor al empleado en este trabajo. Debido a los altos costos de

los métodos de extracción de ARN viral para volúmenes mayores de plasma y, con el objetivo de aumentar la sensibilidad analítica, se plantea adaptar ambos ensayos a un formato “ultrasensible” para lo cual se comenzó a trabajar en colaboración con el Ministerio de Salud de la provincia de Santa Fe. Para ello, se seguirá una estrategia que incluya la centrifugación a alta velocidad de la muestra de plasma (1 ó 2 ml) a fin de concentrar los eventuales virus presentes en la muestra, para así utilizar los mismos equipos de extracción empleados para los prototipos y, por lo tanto, aumentar la sensibilidad analítica de cada determinación. En el marco de esta colaboración, se contempla el desarrollo de un ensayo “ultrasensible” para la detección del ADN del HBV, ya que las infecciones por vía transfusional de este patógeno en PVS son frecuentes [221, 222] y la tendencia internacional indica la necesidad de su incorporación en el tamizaje molecular de donantes junto con HIV-1 y HCV. Esta iniciativa constituye el punto de partida para poder adaptar las metodologías desarrolladas a las necesidades de los efectores públicos que llevarán adelante el tamizaje molecular de los donantes de sangre, acciones que contribuirán efectivamente a aumentar la seguridad transfusional en de Santa Fe el ámbito público.

Otro aspecto que fue abordado en este trabajo de tesis fue el diseño de un sistema de tipificación molecular de las cepas de HIV-1 para proveer una herramienta que facilite la vigilancia genómica de esta infección. Como mencionado previamente, los estudios de caracterización genómica del HIV-1 se han visto impulsados por el impacto potencial de la variabilidad genética viral en las propiedades biológicas de los distintos subtipos virales, lo cual podía traducirse tanto en posibles diferencias en las tasas de progresión de la enfermedad y de transmisión [223-225], como en un comportamiento diferencial de los ensayos de diagnóstico (EIAs, PCR para el ADN proviral y RT-PCR cualitativas para el ARN viral) [226-228] y de monitoreo de la terapia (determinación de la CV) [229-232]. Por otro lado, la información obtenida demostró ser muy valiosa para la investigación epidemiológica, lo que permitió el seguimiento de la propagación viral en un marco espacio-temporal [233].

El ensayo de movilidad del heterodúplex (HMA, del inglés, *Heteroduplex Mobility Assay*) [234] y el análisis de secuencias de segmentos cortos del genoma viral (la mayoría correspondientes a las regiones *gag*, *pol* y/o *env* del virus) son los enfoques experimentales más ampliamente utilizados para la caracterización genética del HIV-1. El HMA se basa en la hibridación de fragmentos genómicos obtenidos por PCR con una serie de fragmentos de referencia pertenecientes a los distintos subtipos y el análisis posterior de la movilidad diferencial de los “híbridos” en geles de poliacrilamida [235, 236]. Por otro lado, la amplificación de un único segmento del genoma viral, y su posterior secuenciación y análisis filogenético, condujo a errores en la caracterización de la epidemia en nuestro país a principios de los años '90 [94]. Ambos métodos poseen una baja resolución genética, ya que sólo realizan una inspección parcial de la composición genómica del HIV-1 y, en general, no aseguran la detección de las CRFs circulantes. Por ejemplo, la CRF12_BF que circula en nuestra región, posee secuencias pertenecientes al

subtipo F en la regiones analizadas por HMA y en la mayor parte de las regiones de *gag*, *pol* y *env* (Figura 10), lo cual hace que no sea detectada como recombinante [237].

Alternativamente, se puede lograr una alta resolución genética mediante el análisis de la secuencia del genoma completo del HIV-1. Sin embargo, debido al bajo rendimiento del clonado de fragmentos largos, la necesidad de un operador con alta experiencia analítica y el costo elevado, su utilidad se ve limitada, especialmente cuando se evalúan grandes cohortes. Estos inconvenientes se han superado parcialmente con el desarrollo de ensayos de genotipado de múltiples regiones del virus. Una de las estrategias adoptadas se basa en los ensayos de hibridación de multirregión (MHA, del inglés *Multiregion Hybridization Assays*) [238]. Los MHA constan, en una primera etapa, en la amplificación de múltiples regiones genómicas virales (por lo general, más de 5 regiones), independientemente del genotipo viral, usando los denominados cebadores universales [239]. Los amplicones obtenidos se utilizan en nuevas reacciones de amplificación con cebadores específicos empleando qPCR, y permitiendo la identificación específica de subtipos virales mediante sondas de hidrólisis [239]. Los MHA fueron particularmente útiles para describir la complejidad de la epidemia [239], proveen información valiosa sobre la proporción relativa de las cepas circulantes [240, 241], permiten identificar nuevas formas virales emergentes [242] y reconocer infecciones duales por medio de sondas subtipo-específicas que hibridan a una misma región genómica [240]. Sin embargo, son de elevado costo y difíciles de estandarizar.

En este escenario, disponer de una estrategia más sencilla que las metodologías previamente mencionadas para caracterizar las cepas circulantes de HIV-1 y monitorear el ingreso de nuevos subtipos y/o cepas recombinantes permitiría controlar con mayor eficiencia la dinámica epidemiológica de la infección por HIV-1 en nuestra región. En base a estas consideraciones, el último objetivo de este trabajo de tesis incluyó el diseño de una estrategia de tipificación basado en la determinación de la T_m de diversas regiones genómicas del virus obtenidas por qPCR y MAC. En el proyecto original, la tipificación se iba a realizar mediante la amplificación de fragmentos cortos de distintas regiones virales y caracterización con un sistema de detección basado en hibridación líquida con sondas específicas para cada subtipo y detección colorimétrica en formato EIA con un procedimiento similar al utilizado en el ensayo RT-PCR/SUD/CIC_{SUD} y en otras metodologías de detección viral desarrolladas en nuestro laboratorio [154, 165, 169]. Si bien la detección colorimétrica con sondas subtipo-específica aumenta la sensibilidad de detección del ARN viral, resultaba una estrategia complicada de optimizar al requerir un gran número de sondas para cada región génica analizada para cubrir el espectro de subtipos circulantes. Además, el hecho de utilizar sondas diseñadas en base a las cepas B, F y CRFs descritas la convertía en una estrategia poco versátil para monitorear el ingreso de nuevos subtipos y/o de cepas recombinantes. Por ello, se optó por el desarrollo de una estrategia de tipificación por la T_m obtenida a partir de qPCR utilizando agentes intercalantes en la química de detección y MAC (Ítem 4.2.2). Según nuestra hipótesis, este enfoque es más versátil, ya que permite seleccionar regiones conservadas entre distintos subtipos

para el diseño de los cebadores, ser adaptada para la tipificación de otros subtipos distintos al B y al F, y de utilidad para monitorear el ingreso de nuevos virus desde otras regiones geográficas. A diferencia de los ensayos MHA, el sistema formulado en este trabajo propone la identificación de los subtipos analizando diversas regiones genómicas del HIV-1 (Figura 30) a través de las Tm correspondientes, estrategia que ya ha sido empleada con éxito en la caracterización de otros patógenos [188-190].

Para probar que el sistema de tipificación planteado fuera factible fue necesario definir una Prueba de Referencia (Inferencia filogenética) que permitiera determinar los subtipos reales de cada uno de los fragmentos del genoma de HIV-1 seleccionados (Tabla 20). De esta forma obtuvimos muestras tipificadas que pudieron ser comparadas con los subtipos definidos en la Prueba en Evaluación (Tm).

Por medio del análisis del genoma completo de los distintos subtipos del HIV-1, se seleccionaron 5 regiones de aproximadamente 200 pb (segmento interno de las regiones *gag*, *pol*, *vif*, *env* y *nef* – Ítem 4.2.3.1) con diferencias en las secuencias nucleotídicas (longitud o contenido GC) entre los subtipos B y F a fin de poder ser discriminadas a través de las Tm (Tabla 21). Si bien en el análisis *in silico* fueron consideradas regiones genómicas de menor tamaño, las mismas no eran factibles de ser discriminadas por subtipos según la estrategia planteada. Una alternativa a considerar es emplear fragmentos génicos pequeños (menores a 100 pb) y discriminar los subtipos virales utilizando qPCR seguida de ensayos de análisis de alta resolución de Tm (HRM, del inglés *High Resolution Melting*). Los ensayos de HRM requieren instrumentación y *software* especializados, además de fluorocromos de baja toxicidad que puedan ser usados a altas concentraciones para la saturación del ADN doble cadena (fluorocromos de tercera generación) [243]. Diversos estudios han demostrado el uso de la HRM para discriminar hasta diferencias de un nucleótido entre secuencias (SNP, del inglés *Single Nucleotide Polymorphism*) [244]. Recientemente, *Cousins* y *col* plantearon una estrategia de tipificación por multi-ensayo donde se amplifican 8 regiones genómicas del HIV-1 (2 en el gen *gag*, 1 en el gen *pol*, y 5 en el gen *env*) y se discriminan subtipos mediante HRM [245]. Otros autores han optado por el desarrollo de qPCR y detección de distintos subtipos virales por medio de sondas tipo Taqman®, las cuales hibridan en zonas variables de la región amplificada [246]. Sin embargo, esta estrategia plantea como desventaja la posibilidad de no detectar variantes dentro de los subtipos que contengan variaciones considerables con respecto a la secuencia de la sonda (número alto de *mismatches*), situación que ha sido reportada recientemente [247].

Con el objetivo de determinar si estas zonas eran factibles de ser discriminadas por Tm al ser amplificadas por qPCR, se llevó a cabo, en primer lugar, el cálculo teórico de las Tm utilizando 3 fórmulas (Owen [197], Wetmur [198] y von Ashen & Witter [199]) desarrolladas para tal fin (Tabla 22). La utilización de estas fórmulas ha sido reportada por otros autores para la selección de las secuencias en estudio, con resultados comparables a los obtenidos por nosotros [199, 248-250]. Considerando los valores de ΔT_m teóricos entre los subtipos B y F, se identificaron 3 de las 5 regiones génicas (segmento

internos de las regiones *gag*, *vif* y *nef*: GAG_{INT}, VIF_{INT} y NEF_{INT}, respectivamente) que cumplieran con el criterio establecido para la diferenciación entre los subtipos B y F (Ítem 4.2.3.2).

Para el segmento externo de la región *gag* (GAG_{EXT}), se optimizaron distintos ensayos para la amplificación de ADN proviral en muestras de PBMC (PCR/GAG_{EXT} y PCRgt/GAG_{EXT}) y de ARN viral en (RT-PCR/GAG_{EXT}) (Ítem 4.2.4.1.1). El sistema PCR/GAG_{EXT} tuvo un bajo rendimiento (21/40: 52%), con la obtención de productos inespecíficos (Figura 34), lo cual dificultó el corte de la banda de tamaño esperado (455 pb) desde la que se purifica el ADN para su posterior clonado. El sistema PCRgt/GAG_{EXT} se desarrolló con el fin de mejorar el desempeño y la sensibilidad del ensayo anterior, lo cual se logró, pudiéndose detectar 13/19 (68%) de las muestras de PBMC analizadas con una mayor especificidad en la reacción (Figura 37). Este bajo rendimiento podría deberse a la calidad de las muestras utilizadas, ya que para esta etapa del trabajo se emplearon lisados de PBMC obtenidos de individuos HIV positivos previamente caracterizados en los años 2002 – 2004. Por otro lado, se ha reportado que los PBMC de individuos crónicamente infectados por el HIV-1 contienen entre 30 - 6300 copias provirales (promedio: 627 copias) /10⁶ PBMC [251]. Con el sistema PCR/GAG_{EXT} se analizaron 10⁵ de PBMC/paciente (3 - 630 copias provirales/reacción), lo cual explica la falta de amplificación observada en 13/40 muestras de PBMC que probablemente tenían un bajo número de secuencias provirales como para ser amplificadas por PCR simple y ser visualizadas luego de electroforesis en gel de agarosa. Por otro lado, cuando se trabajó sobre muestras de plasma, el sistema RT-PCR/GAG_{EXT} permitió obtener bandas evidenciables en el 96% (24/25) de las muestras estudiadas sin observarse la aparición de bandas inespecíficas (Figura 38). De las 58 muestras clínicas, se obtuvieron 51 secuencias virales que fueron analizadas por inferencia bayesiana resultando 37/51 (72,5%) de las secuencias del subtipo B (23 de PBMC y 14 de plasma), y 14/51 (27,5%) del subtipo F/inter-subtipo F1 (4 de PBMC y 10 de plasma) (Ítem 4.4.4.2.1 - Figura 43).

La determinación de los subtipos reales en las muestras en el fragmento GAG_{EXT}, permitió contar con muestras tipificadas para ser utilizadas en el ensayo de qPCR-MAC. Por medio de esta herramienta, se logró determinar los rangos de T_m correspondientes para las secuencias correspondientes al subtipo B (83,36°C – 84,44°C) y F (81,77°C – 82,74°C). El ΔT_m entre ambos subtipos (1,65°C) y el hecho que los rangos no se superpongan entre sí, nos permitió concluir que la estrategia ideada posibilitaba discriminar entre los subtipos B y F del HIV-1 (Ítem 4.2.4.2.2 - Tabla 25). Cuando analizamos las muestras con valores de T_m por fuera de los rangos definidos, se observa que para el subtipo B, los pares de muestras pGAG.V02/pGAG.V18 y pGAG.V07/pGAG.V31 comparten clado con valores de soporte (probabilidad posterior o *posterior*) de 1 y 0,95, respectivamente, indicando una relación evolutiva entre ellos (Figura 43). Algo similar ocurrió con las muestras pGAG.V15, pGAG.V19 y pW529 del subtipo F que comparten un mismo clado, sin embargo el valor de posterior es bajo (0,53) como para poder aseverar una relación evolutiva entre ellos (Figura 43).

A continuación, se realizaron los ensayos de correspondientes para las regiones génicas *vif* y *nef*. De las 40 muestras de PBMC analizadas, no se obtuvo amplificación por PCR/VIF_{EXT} y solo se obtuvieron bandas visibles en 5 muestras PCRgt/VIF_{EXT} (Ítems 4.2.5.2 y 4.2.6.2). Similares rendimientos se consiguieron con los ensayos PCR/NEF_{EXT} y PCRgt/NEF_{EXT}, lográndose amplificar el producto de 399 pb de 5 muestras con el primer ensayo y de ninguna con el segundo ensayo (Ítems 4.2.5.2 y 4.2.6.2). Como se comentó anteriormente, este bajo rendimiento probablemente se deba a la calidad de los lisados de PBMC.

Cuando se trabajó con las 25 muestras de plasma, el ensayo RT-PCR/VIF_{EXT} permitió obtener resultados positivos en 12 muestras (48%), mientras que con el ensayo RT-PCR/NEF_{EXT} en 20 muestras (80%), no presentando bandas inespecíficas (Ítems 4.2.5.2 y 4.2.6.2). En todos los casos, a partir de los segmentos externos (VIF_{EXT} y NEF_{EXT}) se pudo determinar que: *i*) para VIF_{EXT}, 8/12 (67%) de las muestras correspondían al subtipo B y 4/12 (23%) pertenecían al inter-subtipo F1 (Figura 46), y *ii*) para NEF_{EXT}, 9/20 (45%) de las muestras eran subtipo B y 11/20 (55%) del subtipo F (Figura 49). Al igual que para la región *gag*, estas secuencias permitieron disponer de muestras tipificadas en las regiones *vif* y *nef* para evaluar la habilidad de la tipificación por Tm luego qPCR y MAC.

Para VIF_{INT}, los rangos de Tm para las secuencias correspondientes al subtipo B (79,45°C – 80,65°C) y al subtipo F (81,69°C – 82,28°C) no se superpusieron, con un valor de ΔT_m empírica de 1,94°C, lo cual permitió discriminar entre los subtipos (Ítems 4.2.5.2 – Tabla 26). Al analizar las muestras con valores de Tm por fuera de los rangos definidos para el subtipo B (pVIF.V15 y pVIF.V25), a diferencia de lo planteado para la región *gag*, no se pudo realizar ninguna inferencia evolutiva, ya que los valores de soporte (probabilidad posterior o *posterior*) fueron menores a 0,50. Para la muestra del subtipo F (pVIF.22) solo se puede plantear una relación con la cepa de referencia F1.BR.AF005494 (Figura 46).

En contraste, para NEF_{INT}, los rangos de Tm para el subtipo B (83,73°C – 84,56°C) se superponían con el del subtipo F (83,86°C – 84,58°C), por lo que concluimos que las condiciones definidas no eran idóneas para discriminar entre los subtipos (ítem 4.2.6.2 - Tabla 27).

La estrategia de tipificación por medio de la determinación de las Tm de las secuencias por qPCR seguida de MCA mostró una correlación entre el cálculo teórico y el análisis empírico para dos de las tres regiones seleccionadas (*gag* y *vif*) (Figura 50). De esta forma, el cálculo de la Tm por medio de la fórmula de Ashen & Witter permite orientar en la selección de potenciales regiones génicas del HIV-1 factibles de ser discriminadas por Tm y así evitar que la búsqueda de dichas regiones se realice de forma azarosa. Es necesario mencionar la necesidad de incrementar el número de muestras, en especial, para el segmento VIF_{INT}, con el objetivo de mejorar los rangos de Tm empíricas para cada uno de los subtipos.

Por otro lado, es necesario tener en cuenta, que en el momento que se comenzó con el diseño de la estrategia de tipificación solo estaban reportadas 33 CRFs globalmente, y solo se conocían las CRF12_BF y CRF17_BF en la región. Como puede observarse en la Figura 30, con las 5 regiones genómicas propuestas

era factible diferenciar las 2 variantes recombinantes entre sí y de los subtipos puros. Sin embargo, posteriormente se informaron el resto de las formas recombinantes (CRF28_BF, CRF29_BF, CRF38_BF, CRF39_BF, CRF40_BF, CRF44_BF y CRF46_BF). Dentro de este grupo, se debe destacar que la CRF28_BF sería tipificada como de subtipo B puro y la CRF46_BF como de subtipo F puro, mediante la estrategia general propuesta. Con respecto a la CRF28_BF, es posible adaptar la zona seleccionada del gen *gag* o del gen *pol* en una primera instancia, con el objetivo que se amplifique la única región en la cual esta cepa es inter-subtipo F1 (1323 → 2571 nt) (Figura 30). Por otro lado, es necesario destacar que la CRF46_BF es casi en la totalidad del genoma inter-subtipo F1, existiendo solo una zona de 52 nucleótidos en el extremo 3' del gen *nef* (9366 → 9417 nt) del subtipo B, lo que hace prácticamente imposible caracterizarla como variante recombinante si no se realiza la secuenciación completa de su genoma (Figura 30). En vista a esto, y además considerando la gran cantidad de URFs circulantes que conforman la epidemia a nivel regional, no debe perderse de vista que el método de tipificación molecular propuesto serviría solo como un *screening* inicial de las muestras detectadas por el ensayo RT-PCR/SUD/CIC_{SUD} desarrollado para la detección temprana del HIV-1. De esta forma, se lograría una aproximación a la identificación de las cepas detectadas, no pudiendo reemplazar la genotipificación por la caracterización completa del genoma, la cual se considera la prueba de referencia. La amplia diversidad de variantes que circulan en una región determinada, es un inconveniente descrito en su momento para los ensayos de HMA [235, 237], y es un problema a considerar en los actuales métodos de MHA, sea en la estrategia seguida por nosotros como la desarrollada en otros estudios [238, 239]. Como fue comentado extensamente, la dinámica de la epidemia es impredecible debiéndose adaptar y actualizar los ensayos continuamente considerando la realidad y problemática en cada región geográfica.

Cuando se analizan las 11 muestras que pudieron ser caracterizadas en las regiones *gag* y *vif*, podemos observar que 6 muestras (V06, V11, V18, V25, V31 y V33) presentaron subtipo B en ambas regiones, 4 muestras (V14, V17, V22 y V23) inter-subtipo F1 en ambas regiones, y solo 1 muestra (V15) mostró el inter-subtipo F1 en la región *gag* y el subtipo B en la región *vif*, patrón que no corresponde a ninguna de las CRFs descritas (Figura 30). Aunque la tipificación de la región *nef* por Tm no fue factible, la muestra V15 fue clasificada dentro del subtipo F1 por filogenia (Figura 49). El análisis filogenético de los segmentos GAG_{EXT} y VIF_{EXT} de la muestra V15 (Figuras 51 y 52) mostró que esta variante podría ser una posible recombinante con origen evolutivo en cepas circulantes en San Pablo (Brasil), presentando entonces un patrón F (*gag*) – B (*vif*) – F (*nef*). Sin embargo, no se puede excluir que se trate de una infección dual, con dos cepas distintas del HIV-1. Para dilucidar este interrogante es necesario realizar la secuenciación completa del genoma viral mediante “*overlapping* RT-PCR”. Estudios futuros develarán el papel que este tipo de variantes puedan desempeñar en la evolución de la epidemia del HIV en Sudamérica. En ese sentido, los esfuerzos para facilitar la identificación y caracterización de nuevas

variantes son necesarios a fin de incrementar la vigilancia genética del HIV-1 en la región y tomar las medidas necesarias para su control.

En base a esto, y a pesar de solo poder disponer de 2 regiones (*gag* y *vif*) válidas para tipificar por Tm de las 5 seleccionadas originalmente, es importante destacar que la estrategia propuesta permitió identificar una muestra con discordancia de subtipos entre ambas regiones, corroborando su utilidad. De esta forma, queda planteada la necesidad de profundizar este estudio con el objetivo de validar la estrategia de tipificación planteada en este trabajo de tesis: *i)* seleccionando otras regiones genómicas en una nueva exploración del genoma del HIV-1, *ii)* aumentando el número de muestras de forma de constituir una base de datos más amplia con los subtipos caracterizados por filogenia y poder establecer los rangos de variación de Tm para cada subtipo con mayor significancia estadística, y *iii)* ampliando la estrategia al análisis de otros subtipos virales que se han introducido recientemente en la región (por ejemplo, subtipos A y C) [252, 253].

Finalmente, quedaría pendiente comprobar el uso de las metodologías desarrolladas en este trabajo de tesis en un contexto clínico. De esta forma, a la muestra de plasma del paciente con sospecha de primoinfección por el HIV-1, se le adicionaría el CIC_{SUD}, se extraería los ARNs virales (HIV-1 y Qβ_{SUD}) y se procedería a determinar el estado de infección con el ensayo de tamizaje RT-PCR/SUD/CIC_{SUD}. En caso de resultar HIV-positivo, se procedería a la tipificación con la estrategia planteada en base a la Tm por qRT-PCR y MAC a fin de tener una primera evidencia del subtipo o recombinante involucrado en la infección.

Como se mencionó anteriormente, la variabilidad genómica del HIV-1 puede afectar dramáticamente el rendimiento de los ensayos moleculares, sea para la detección de ácidos nucleicos que para la cuantificación de la CV. Un estudio donde se comparan los sistemas comerciales *Procleix* (Gen Probe) y COBAS® (Roche) demostró claramente la existencia de diferencias significativas entre los ensayos NAT para detectar bajas concentraciones de variantes de HBV, HCV y HIV-1 de diferentes genotipos [254]. Otros estudios informaron la presencia de resultados falsamente negativos y subestimación de la CV con diversos ensayos comerciales en el análisis de individuos infectados con cepas no-B del HIV-1, principalmente los subtipos A, E y G [228, 255]. En un estudio reciente realizado en Italia se describe una variante del HIV-1 no detectada por NAT (sistema COBAS de Roche), identificada como una URF relacionada a la CRF12_BF circulante en Sudamérica [108]. Posteriormente, se identificaron recombinantes BF similares en 11 de 19 pacientes infectados con CV subestimadas. Además, 2 de los 8 pacientes restantes presentaban formas recombinantes relacionadas con CRF02_AG y CRF14_BG, y 5 con cepas del subtipo B [256]. En 5 casos con resultados falsamente negativos por NAT en Alemania, 2 de ellos sugieren una infección con URF_BF [257].

En el II Congreso Nacional de SIDA realizado el año 2009 [258] se comunicó la presencia de cepas recombinantes BF del HIV-1 circulantes en Argentina que no pudieron ser detectadas por ensayos comerciales basados en la amplificación de secuencias genómicas de la región *gag* (COBAS® *Amplicor HIV-*

1 *Monitor* y *NucliSens EasyQ HIV-1*). El único test que pudo detectar estas cepas fue el ensayo cuantitativo *Quantiplex HIV-1 RNA Assay* (actualmente *VERSANT® 440 Molecular System*), un método de amplificación de la señal mediante hibridación molecular de secuencias del gen *pol* del HIV-1 a sondas específicas.

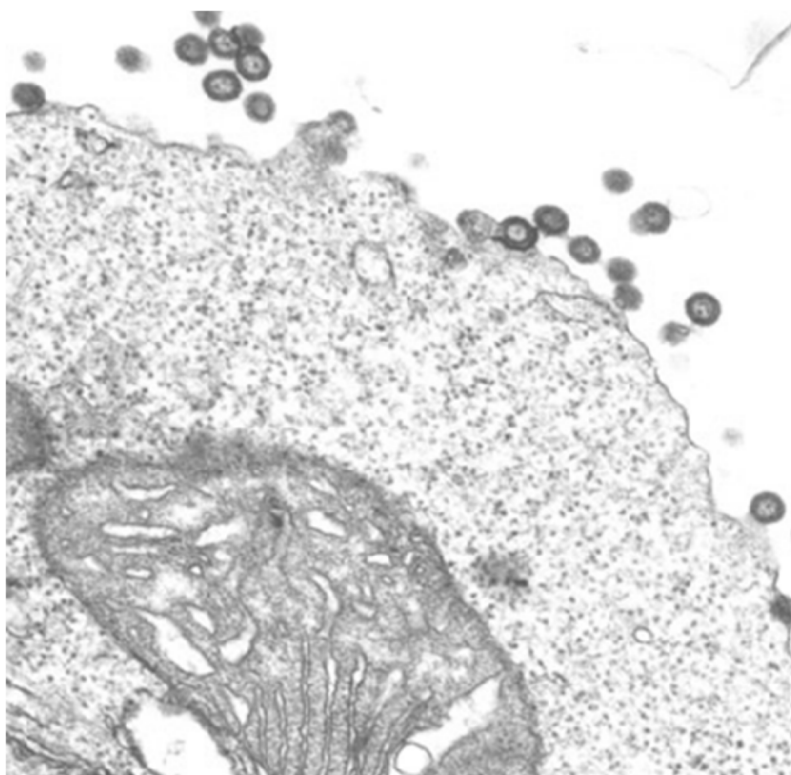
Los sistemas NAT disponibles comprenden la amplificación de una única región del genoma del HIV-1 (mono-*target*) comprendida dentro del gen *gag*. Si bien existen sistemas mono-*target* para los cuales aún no se han reportado resultados falsamente negativos, la evolución de las variantes del HIV-1 parece impredecible y, por lo tanto, podría afectar la zona de hibridación de los cebadores y sondas. Aunque las consideraciones generales para el diseño de los oligonucleótidos sea respetada para tolerar un número dado de *mismatches*, es necesario la realización de estudios experimentales para medir el efecto de cada *mismatch* o combinación de ellos en el rendimiento del ensayo [259]. En nuestro estudio, el bajo rendimiento de los cebadores ALL (62,5%) y SK (87,5%) evidencia la importancia de este hecho cuando se los ensayó en muestras clínicas (Tabla 15).

Dado que el riesgo de un resultado falsamente negativo en el tamizaje de donantes puede ser traducido directamente en el riesgo de transmisión por transfusión del HIV-1 si el individuo está en el PVS al momento de la donación, debería ser considerado el desarrollo de ensayos que amplifiquen más de una única región del virus (ensayos doble-*target*). Estos ensayos reducirían el riesgo residual de infección por transfusión cuando uno de los sistemas de amplificación se ve afectado por la emergencia de una nueva variante viral [257].

El desempeño de los métodos moleculares cuantitativos, es decir, aquellos desarrollados para la cuantificación de la viremia o CV, fue extensamente estudiado. Diversos estudios comparativos han demostrado que la sensibilidad y especificidad de los ensayos de CV varían dependiendo del grupo o subtipo viral, especialmente en subtipos no-B, en formas recombinantes complejas y en los grupos O, N y P. Los datos disponibles indican que aquellos dirigidos a la región altamente conservada de la integrasa del gen *pol* del genoma del HIV-1 pueden estar sujetos a una menor variabilidad que los ensayos dirigidos al gen *gag* [260-262]. Sin embargo, la inhibición de la acción de las distintas proteínas virales con actividad enzimática (*proteasa*, *transcriptasa reversa*, *RNasa* e *integrasa*) codificadas en el gen *pol* son el mecanismo de acción de la mayoría de los fármacos antirretrovirales. Esto se traduce en la generación de múltiples mutaciones en las regiones génicas codificantes para otorgar al virus la capacidad de escapar a la acción de los fármacos (fenómeno de resistencia), además de los polimorfismos naturales que se originan en el ciclo replicativo viral. Hasta el presente se encuentran disponibles en el mercado 24 fármacos antirretrovirales: 8 inhibidores nucleosídicos de la *transcriptasa reversa* (INTR), 3 inhibidores no nucleosídicos de la *transcriptasa reversa* (INNTR), 10 inhibidores de la *proteasa* (IP), 1 inhibidor de la fusión, 1 antagonista del correceptor CCR5, y 1 inhibidor de la *integrasa* [263]. Como los inhibidores de la *integrasa* son fármacos de segunda línea y se administran solamente a individuos con múltiples fallas a

tratamientos previos [264], la región génica de la *integrasa* será la que presente menor variabilidad inter-individuo debido a la presión de selección por resistencia a los fármacos antirretrovirales. Por lo tanto, la región correspondiente a la *integrasa* viral podría ser considerada en el diseño de ensayos NAT doble-*target*, conjuntamente con el gen *gag* utilizado actualmente en los ensayos desarrollados. De esto se desprende que la situación epidemiológica es compleja y requiere de esfuerzos continuos para disponer de herramientas de detección diseñadas teniendo en cuenta la dinámica evolutiva de la infección por el HIV-1, a fin de garantizar un diagnóstico certero mientras no se disponga de vacunas preventivas ni de tratamientos que logren la erradicación del virus.

6. CONCLUSIONES



En este trabajo de tesis se diseñó una herramienta diagnóstica, el sistema RT-PCR/SUD/CIC_{SUD}, para la detección temprana del HIV-1, capaz de detectar las secuencias de las variantes virales (subtipos y CRFs) circulantes a nivel regional, y que incorpora un CIC con el fin de garantizar la trazabilidad del resultado, pudiendo ser aplicable al tamizaje molecular de donantes de sangre.

En la primera parte de este trabajo de tesis utilizamos los sistemas de cebadores SUD y ALL, y la sonda S-Gagp24 para la detección de ADN proviral en muestras de individuos infectados. Ambos sistemas fueron comparados con los cebadores SK y sonda SK102, el que se consideró como ensayo de referencia. Los resultados demostraron que si bien los distintos sistemas eran capaces de detectar hasta 50 copias de plásmidos por reacción, el ensayo PCR/SUD constituía la mejor herramienta para la detección viral cuando se los ensayaba en muestras clínicas.

Para el desarrollo de los CICs, se reemplazaron las secuencias correspondientes a los cebadores SUD y SK en el genoma del fago Q β . De esta manera se obtuvo el genoma del bacteriófago Q β _{SUD} y Q β _{SK} (a utilizarse como CI), clonado como ADNc bajo el control transcripcional de T7. Se obtuvieron las partículas fágicas modificadas Q β _{SUD} y Q β _{SK} que, si bien presentaron deficiencias en su capacidad de infección respecto al fago salvaje, contenían ARN recombinante encapsidado, fueron resistentes a la degradación por ARNasa y estables a 4°C durante al menos 24 meses.

Q β _{SUD} y Q β _{SK} fueron incorporados satisfactoriamente como CICs en los sistemas de detección para HIV-1 RT-PCR/SUD y RT-PCR/SK, respectivamente. Los amplicones correspondientes al HIV-1 y al CIC (CIC_{SUD} y CIC_{SK}) fueron discriminados con éxito por las sondas específicas para cada uno.

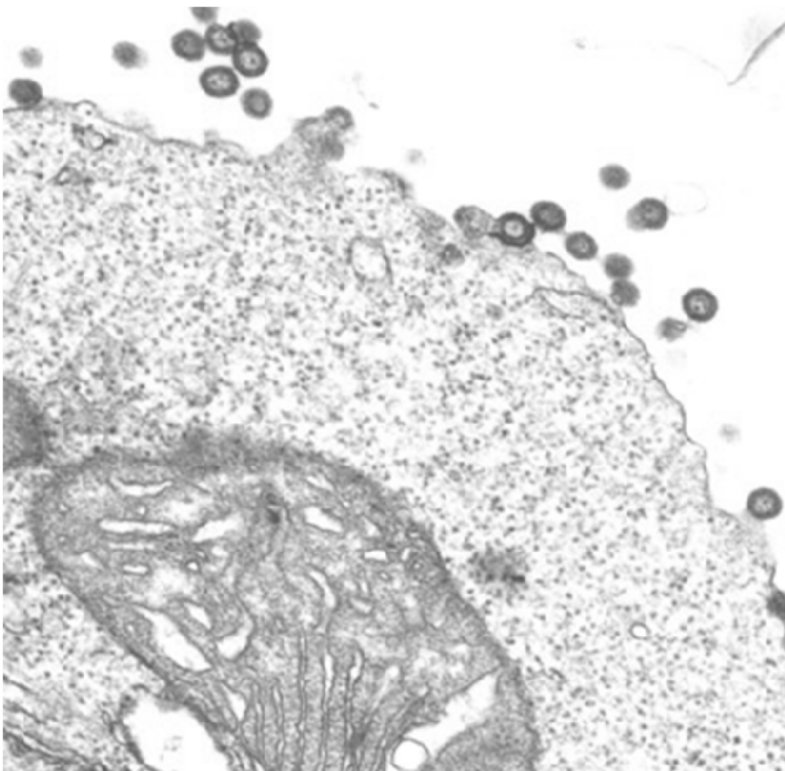
El ensayo RT-PCR/SUD desarrollado fue capaz de detectar todos los subtipos del grupo M, así como las variantes del grupo N y grupo O del HIV-1. En su versión definitiva, RT-PCR/SUD/CIC_{SUD}, el prototipo permitió detectar al menos 185 copias/reacción de ARN del HIV-1. La co-amplificación de ambos genomas virales (HIV-1 y Q β _{SUD}) fue posible sin inhibición, y mostró un desempeño similar al ensayo de referencia (RT-PCR/SK/CIC_{SK}).

En la segunda parte de este trabajo de tesis, se describió una estrategia para la tipificación de variantes del HIV-1 en base a la T_m obtenida mediante qPCR seguida de MCA, que permite el genotipado de múltiples regiones del virus. La misma consta de la selección de regiones genómicas con diferencias en las secuencias nucleotídicas (longitud o contenido GC) entre los subtipos B y F a fin de poder ser discriminadas a través de las T_m. Los resultados obtenidos mostraron una correlación entre el cálculo teórico y el análisis empírico para las regiones *gag* y *vif* del HIV-1. El cálculo teórico de la T_m serviría para realizar la selección de la región génica del HIV-1 y determinar el diseño de posibles cebadores para reacciones de amplificación por qPCR. El análisis de muestras de genotipos definidos por filogenia posibilitó obtener rangos de T_m empíricos para el subtipo B y F, que servirían como patrones para tipificar muestras analizadas a futuro. Una de las muestras tipificada por T_m presentó un patrón *gag/vif*

(F/B) que no corresponde a ninguna de las CRFs descritas, pudiendo ser una posible recombinante con origen evolutivo en variantes circulantes en San Pablo.

En conclusión, hemos demostrado que el sistema de amplificación RT-PCR/SUD/CIC_{SUD} desarrollado en este trabajo de tesis permite identificar los distintos subtipos del HIV-1, con eficiencia comparable al ensayo de referencia, y por lo tanto, factible de ser adaptado como sistema NAT para el tamizaje de donantes de sangre en el ámbito público de la provincia de Santa Fe. Además, la estrategia para el diseño y construcción de CICs confiables, seguros y resistentes a ARNasa empleada en este trabajo, permite asegurar la calidad y validación de los resultados obtenidos, contribuyendo así a la disminución de resultados falsamente negativos por fallas en el procesamiento y/o amplificación del ARN viral en los análisis realizados, especialmente en los utilizados en la metodología NAT aplicada al tamizaje de donantes de sangre, previniendo así la transmisión de esta enfermedad. Por último, la estrategia de tipificación basada en T_m planteada aporta una herramienta adicional para facilitar la identificación de los subtipos y recombinantes circulantes en los individuos infectados, y detectar de forma rápida variantes virales con circulación poco frecuente en la región a fin de considerar a futuro la caracterización completa del genoma.

7. ANEXOS



ANEXO 1

Formas recombinantes circulantes (CRF) descritas a nivel global reportadas por “Los Alamos Databases”.

NOMBRE	CEPA DE REFERENCIA	SUBTIPOS	AUTOR
CRF01_AE	CM240	A, E	J.K. Carr
CRF02_AG	IbNG	A, G	J.K. Carr
CRF03_AB	Ka153	A, B	K. Liitsola
CRF04_cpx	94CY032	A, G, H, K, U	D. Paraskevis
CRF05_DF	VI1310	D, F	T. Laukkanen
CRF06_cpx	BFP90	A, G, J, K	R. B. Oelrichs
CRF07_BC	97CN54	B', C	R. Wagner
CRF08_BC	97CNGX-6F	B', C	F.E. McCutchan
CRF09_cpx	96GH2911	A, G, U	F.E. McCutchan
CRF10_CD	TZBF061	C, D	I.N. Koulinska
CRF11_cpx	GR17	A, E, G, J, U	M. Peeters
CRF12_BF	ARMA159	B, F1	J.K. Carr
CRF13_cpx	96CM-1849	CRF01, A, G, J, U	K. Wilbe
CRF14_BG	X397	B, G	R. Najera
CRF15_01B	99TH.MU2079	CRF01, B	F.E. McCutchan
CRF16_A2D	97KR004	A2, D	U. Visawapoka
CRF17_BF	ARMA038	B, F1	J.K. Carr
CRF18_cpx	CU76	A1, F, G, H, K, U	M. Thomson
CRF19_cpx	CU7	A1, D, G	M. Thomson
CRF20_BG	Cu103	B, G	M. Thomson
CRF21_A2D	99KE_KER2003	A2, D	F.E. McCutchan
CRF22_01A1	02CMLT72	CRF01, A1	J.K. Carr
CRF23_BG	CB118	B, G	M. Thomson
CRF24_BG	CB378	B, G	M. Thomson
CRF25_cpx	02CM_1918LE	A, G, U	J.K. Carr
CRF26_AU	02CD_MBTB047	A, U	M. Peeters
CRF27_cpx	04FR-KZS	A, E, G, H, J, K, U	M. Peeters
CRF28_BF	BREPM12609	B, F1	R. Diaz
CRF29_BF	BREPM16704	B, F1	R. Diaz
CRF30_0206	00NE36	CRF02, CRF06	M. Peeters
CRF31_BC	04BR142	B, C	M. Soares
CRF32_06A1	EE0369	CRF06, A1	M. Adojaan
CRF33_01B	05MYKL007	CRF01, B	K.P. Ng & K.K. Tee
CRF34_01B	OUR2275P	CRF01, B	F.E. McCutchan
CRF35_AD	AF095	A, D	F.E. McCutchan
CRF36_cpx	NYU830	CRF01, CRF02, A, G	R. Powell

Formas recombinantes circulantes (CRF) descritas a nivel global reportadas por “Los Alamos Databases” (continuación).

NOMBRE	CEPA DE REFERENCIA	SUBTIPOS	AUTOR
CRF37_cpx	NYU926	CRF01, CRF02, A, G, U	R. Powell
CRF38_BF	UY03_3389	B, F1	C. Lopez-Galindez
CRF39_BF	03BRRJ103	B, F1	M.G. Morgado
CRF40_BF	05BRRJ055	B, F1	M.G. Morgado
CRF41_CD	CO6650V1	C, D	S. Tovanabutra
CRF42_BF	luBF_13_05	B, F1	J-C. Schmit
CRF43_02G	J11223	CRF02, G	C. Brennan
CRF44_BF	CH80	B, F1	M. Thomson
CRF45_cpx	04FR.AKU	A, K, U	M. Peeters
CRF46_BF	01BR087	B, F1	S. S. Sanabani
CRF47_BF	P1942	B, F1	M. Thomson
CRF48_01B	07MYKT014	CRF01, B	Y. Takebe
CRF49_cpx	N28353	A1, C, J, K, U	T. de Silva & M. Cotten
CRF50_A1D		A1, D	G. Foster
CRF51_01B	HM021	CRF01, B	O.T. Ng
CRF52_01B	M043	CRF01, B	J. Li
CRF53_01B	11FIR164	CRF01, B	K.K. Tee
CRF54_01B	09MYSB023	CRF01, B	K.K. Tee
CRF55_01B	HNCS102056	CRF01, B	X. Han
CRF57_BC	1439	B, C	L. Li
CRF59_01B	09LNA423	CRF01, B	X. Han
CRF61_BC	JL100010	B, C	X. Li

ANEXO 2



Comité de Bioética
Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas
UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO
Suipacha 531 - S2002LRK Rosario - Argentina
Teléfono/Fax: 54 (0341) 480-4599
Correo electrónico: secyt@fbioyf.unr.edu.ar



Referencia : Expte. N° 7380/002


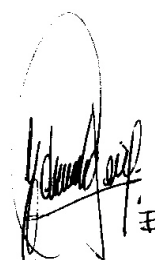
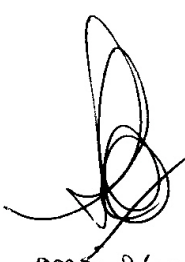


Rosario, 15 de mayo de 2009.-

En el día de la fecha se reúne el Comité de Bioética a fin de revisar el proyecto presentado por la Dra. Adriana Giri: "Desarrollo de un ensayo para el tamizaje molecular en Bancos de Sangre de las cepas circulares del Virus de la Inmunodeficiencia Humana tipo 1 en Argentina" Expte. N°: 7380/002

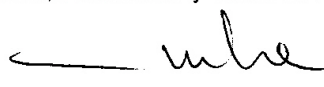
Tras el análisis de la documentación la Comisión acuerda que la información remitida cumple con los requisitos para su desarrollo, por tanto se resuelve su aprobación por considerarlo éticamente aceptable.

Por lo anteriormente expuesto, notifíquese a la interesada.

Sin otro particular se imprimen dos copias a igual efecto y del mismo tenor


 LUQUE, A.
 
 E. García
 
 S. Sánchez
 
 Pines, M.
 
 E. Sánchez B.

Firma, Aclaración y fecha de notificación


 ADRIANA GIRI
 4/6/2009

ANEXO 3

CEBADORES				
NOMBRE	SECUENCIA 5'→3'	BLANCO	POSICIÓN#	FUNCIÓN ENSAYO
ALL-Fw^(A)	ACYATCAATGARGARGCTGC	<i>gag</i> HIV-1	1399→1418 ⁽¹⁾	CS ALL
ALL-Rv^(A)	[B]TATTGTCYTMRRGTAC	<i>gag</i> HIV-1	1511→1530 ⁽¹⁾	CAS ALL
SK145^(B)	[B]AGTGGGGGACATCAAGCAGCATGCAAAAT	<i>gag</i> HIV-1	1359→1388 ⁽¹⁾	CS SK
SKCC1B^(B)	GGAAGTGACATAGCAGGAACTACTAGTA	<i>gag</i> HIV-1	1486→1513 ⁽¹⁾	CAS SK
SUD-F1^(A)	ACCATCAATGAGGAAGCTGC	<i>gag</i> HIV-1	1399→1418 ⁽¹⁾	CS SUD
SUD-R1^(A)	[B]TATTGTTCTCGAAGGTAC	<i>gag</i> HIV-1	1511→1530 ⁽¹⁾	CAS SUD - GAG _{EXT}
A1-Bst98_{SUD}^(A)	TATCTTAAGTCGACCATCAATGAGGAAGCTGCTAGCGATATTGCGG	A1 Qβ	NC	CS MegaSUD
A1-Nsi_{SUD}^(A)	GACATGCAITTTCTATTGTTCTGAAGGGTACAGGAACGACTATCA	A1 Qβ	NC	SAC MegaSUD
A1-Bst98_{SK}^(A)	TATCTTAAGTCGAGTGGGGGACATCAAGCAGCCCATGCAAAATGCGGCCTATCACGCCGAT	A1 Qβ	NC	CS MegaSK
A1-Nsi_{SK}^(A)	GACATGCAITTTCTACTAGTAGTTCTGCTATGTCTACTTCCCTATCACGGGCTTGAATAGG	A1 Qβ	NC	SAC MegaSK
Qβ-S^(A)	ATAAATGCTATTGCTCTCT	A1 Qβ	2170→2189 ⁽²⁾	CS Qβ _{A1}
Qβ-AS^(A)	[B]ATCCTTAGTTACTAAGCAC	A1 Qβ	2330→2348 ⁽²⁾	CAS Qβ _{A1}
GagSense^(A)	GACACCAAGGAAGCTTTAGA	<i>gag</i> HIV-1	1075→1094 ⁽¹⁾	CS GAG _{EXT}
Gag-X^(A)	GCATTATCAGAAGGAGCCACCC	<i>gag</i> HIV-1	1309→1330 ⁽¹⁾	CS GAG _{INT}
VIF102^(A)	TGGAACACAGATGGCAGGTG	<i>vif</i> HIV-1	5042→5061 ⁽¹⁾	CS VIF _{EXT}
VIF-F2^(A)	ACAGGAGAAAGAGACTGGCA	<i>vif</i> HIV-1	5260→5279 ⁽¹⁾	CS VIF _{INT}
VIF301^(A)	CTACCTTGTTATGTCTGCT	<i>vif</i> HIV-1	5448→5467 ⁽¹⁾	CAS VIF _{EXT} - VIF _{INT}
NEF-F1^(A)	GCCTGGCTAGAAGCACAAGA	<i>nef</i> HIV-1	8962→8981 ⁽¹⁾	CS NEF _{EXT}
NEF-F2^(A)	TGGGTCTACCACACACAAGG	<i>nef</i> HIV-1	9133→9152 ⁽¹⁾	CS NEF _{INT}
NEF-R1^(A)	TCAAACTTCCACATTAAACAC	<i>nef</i> HIV-1	9334→9353 ⁽¹⁾	CAS NEF _{EXT} - NEF _{INT}
M13-Fw	GTAAACGACGGCCAG	pGEM®-T-Easy	NC	CS PCR de colonia
M13-Rv	CAGGAACAGCTATGAC	pGEM®-T-Easy	NC	CAS PCR de colonia

SONDAS DE HIBRIDACIÓN					
NOMBRE	SECUENCIA 5'→3'	BLANCO	POSICIÓN#	FUNCIÓN	ENSAYO
S-Gagp24 ^(A)	[F]CCWAGGGGAAGTGAYATAGC	gag HIV-1	1480→1499 ⁽¹⁾	SH	ALL - SUD
SK102 ^(B)	[F]GAGACCATCAATGAGGAAAGCTGCAGAATGGGAT	gag HIV-1	1396→1428 ⁽¹⁾	SH	SK
S-Qβ ^(A)	[F]ATAGTTGGCTTTTGGCGCG	A1 Qβ	2224→2242 ⁽²⁾	SH	Qβ _{A1}

Referencias:

- [B]: Biotina. [F]: Fluoresceína. Y = C + T - R = A + G - M = C + A - W = A + T.
- CS: Cebador sentido. CAS: Cebador antisentido. SH: Sonda de hibridación.
- NC: no corresponde
- ⁽¹⁾ Posición nucleotídica referida a la cepa B.FR.83.HXB2 (N° GenBank: K03455)
- ⁽²⁾ Posición nucleotídica referida a la cepa Enterobacteria phage Qbeta strain HL4-9 (N° GenBank: FJ483841.1)
- ^(A) Oligonucleótidos diseñados en este trabajo de tesis.
- ^(B) Oligonucleótidos diseñados en Zijenah, Humphrey et al. 1999.

ANEXO 4

A. Alineamiento de los cebadores ALL y SUD, y la sonda S-Gagp24 con los subtipos y CRFs de referencia del HIV-1.

Subtipos	ALL-Fw			SUD-FI			ALL-Rv			SUD-R1			S-Gagp24		
	País	Abreviatura	Año de aislamiento	Número de acceso	Mismatch	mismatch	mismatch	mismatch	mismatch	mismatch	mismatch	mismatch	mismatch	mismatch	mismatch
SUBTIPOS	A1	Australia	AU	03	DO676872	0	0	1	1	3	3	0	0	0	0
	A1	Ruanda	RW	92	A8234421	0	0	0	0	2	2	0	0	0	0
	A1	Uganda	UG	92	A8234429	0	0	0	0	2	2	0	0	0	0
	A2	RD Congo	CD	97	A7286238	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0
	A2	Camerún	CM	01	GU201516	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	A2	Chipe	CY	94	A7286237	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	B	Francia	FR	83	H08465	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	B	Países Bajos	NL	00	A4233887	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	B	Tailandia	TH	90	A1739851	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	B	EL.UU.	US	98	A133295	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SUBTIPOS	C	Reino Unido	GB	92	U52553	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	C	Etiopia	ET	86	U46016	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	C	India	IN	95	A407155	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	C	Zaire	ZA	04	A772609	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	D	RD Congo	CD	83	H08464	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	D	Camerún	CM	01	A1371157	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	D	Tanzania	TZ	01	A1233311	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	D	Uganda	UG	94	U88824	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	F1	Belgica	BE	93	A077336	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	F1	Reino Unido	GB	93	A4005484	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SUBTIPOS	F1	Finlandia	FI	93	A075703	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	F1	Francia	FR	96	A249238	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	F2	Camerún	CM	02	A1371158	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	F2	Camerún	CM	95	A249236	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	F2	Camerún	CM	95	A249237	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	F2	Camerún	CM	97	A437956	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	G	Belgica	BE	96	A084936	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	G	Kenia	KE	93	A061641	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	G	Nigeria	NG	92	U88826	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	G	Portugal	PT	x	A1612637	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SUBTIPOS	H	Belgica	BE	93	A1100127	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	H	Belgica	BE	93	A1100128	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	H	Reino Unido	GB	90	A4005486	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	H	Reino Unido	GB	00	F711703	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	J	RD Congo	CD	97	E614151	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	J	Camerún	CM	04	GU237072	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	J	Suecia	SE	93	A080394	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	K	RD Congo	CD	97	A249235	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	K	Camerún	CM	96	A249239	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	K	Camerún	CM	96	A249239	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SUBTIPOS	O1_AE	Afganistán	AF	07	Q0477441	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	O1_AE	China	CN	05	GU564221	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	O1_AE	Tailandia	TH	90	U84771	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	O2_AG	Camerún	CM	99	A1271690	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	O2_AG	Liberia	LR	x	A4485636	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	O2_AG	Nigeria	NG	x	U39106	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	O3_AB	Ruanda	RU	97	A132376	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	O4_cpx	Chipe	CY	94	A400537	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	O4_cpx	Reino Unido	GB	91	A1138620	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	O4_cpx	Reino Unido	GB	97	A119819	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CRFS	O5_DF	Belgica	BE	93	A407698	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	O5_DF	Belgica	BE	x	A1193253	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	O5_DF	España	ES	99	A127107	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	O6_cpx	Australia	AU	96	A4064699	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	O6_cpx	Estonia	EE	01	A1356559	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	O6_cpx	Ghana	GH	03	A8248851	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	O7_BC	China	CN	05	E1368372	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	O7_BC	China	CN	05	E1368370	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	O7_BC	China	CN	98	A7286230	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	O8_BC	China	CN	06	H0067748	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CRFS	O9_cpx	Costa de Marfil	CI	00	A486553	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	O9_cpx	Ghana	GH	96	A103605	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	O9_cpx	Senegal	SN	95	A103603	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	O9_cpx	EL.UU.	US	99	A103607	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	O9_cpx	Tanzania	TZ	96	A128548	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	O9_cpx	Tanzania	TZ	96	A289549	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	O9_cpx	Tanzania	TZ	96	A289549	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	O9_cpx	Tanzania	TZ	96	A289549	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	O9_cpx	Tanzania	TZ	96	A289549	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	O9_cpx	Tanzania	TZ	96	A289549	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

A. Alineamiento de los cebadores ALL y SUD, y la sonda S-Gagp24 con los subtipos y CRFs de referencia del HIV-1 (continuación).

CRFs	ALL-FW			SUD-F1			ALL-RV			SUD-R1			S-Gagp24		
	País	Precedencia	Abreviatura	Año de aislamiento	Número de acceso	Mismatch	A C G T A A T G A R G A G C T G C	Mismatch	G T A C T C Y K C A R G A C A A A T A	Mismatch	G T A C C C T T C A G G A A C A A A T A	Mismatch	C C W A G G G A A G T G A T A T A G C	Mismatch	
10_CD	Tanzania		TZ	96	A728550	1	. . . A	1	0	0	0	
11_cpx	Camerún		CM	95	A493624	0	0	0	0	0	
11_cpx	Camerún		CM	96	A493623	0	0	0	0	0	
11_cpx	Camerún		CM	97	A927178	0	0	0	0	0	
12_BF	Argentina		AR	97	A408629	0	0	0	0	0	
12_BF	Argentina		AR	97	A408630	0	0	0	0	0	
12_BF	Argentina		AR	99	A438936	0	0	0	0	0	
13_cpx	Camerún		CM	02	D3845388	0	0	0	0	0	
13_cpx	Camerún		CM	04	D3845387	0	0	0	0	0	
13_cpx	Camerún		CM	96	A460972	0	0	0	0	0	
14_BG	España		ES	00	A450096	0	0	0	0	0	
14_BG	España		ES	00	A450097	0	0	0	0	0	
14_BG	Portugal		PT	00	GU230137	0	0	0	0	0	
15_01B	Tanzania		TH	96	D354120	0	0	0	0	0	
15_01B	Tanzania		TH	99	A451814	0	0	0	0	0	
15_01B	Tanzania		TH	99	A438976	0	0	0	0	0	
16_A2D	Kenia		KE	91	A945736	0	0	0	0	0	
16_A2D	R. de Corea		RR	97	A728239	1	1	0	0	0	
17_BF	Argentina		AR	02	EJ581825	0	0	0	0	0	
17_BF	Bolivia		BO	02	EJ581827	0	0	0	0	0	
17_BF	Peru		PE	02	EJ581828	0	0	0	0	0	
18_cpx	Camerún		CM	97	A377959	0	0	0	0	0	
18_cpx	Cuba		CU	99	A586541	0	0	0	0	0	
18_cpx	Cuba		CU	99	A894993	0	0	0	0	0	
19_cpx	Cuba		CU	99	A938971	0	0	0	0	0	
19_cpx	Cuba		CU	99	A938970	0	0	0	0	0	
19_cpx	Cuba		CU	99	A984994	0	0	0	0	0	
20_BG	Cuba		CU	99	A938645	0	0	0	0	0	
21_A2D	Kenia		KE	91	A945737	0	0	0	0	0	
21_A2D	Kenia		KE	99	A457051	1	1	0	0	0	
21_A2D	Kenia		KE	99	A457072	0	0	0	0	0	
22_01A1	Camerún		CM	01	A971159	0	0	0	0	0	
22_01A1	Camerún		CM	02	G022959	0	0	0	0	0	
23_BG	Cuba		CU	03	A900571	0	0	0	0	0	
23_BG	Cuba		CU	03	A900572	0	0	0	0	0	
24_BG	Cuba		CU	03	A900574	0	0	0	0	0	
24_BG	Cuba		CU	03	A900575	0	0	0	0	0	
24_BG	España		ES	08	F670526	0	0	0	0	0	
25_cpx	Camerún		CM	06	EJ693240	1	1	0	0	0	
25_cpx	Arabia Saudita		SA	03	EJ697906	0	0	0	0	0	
25_cpx	Arabia Saudita		SA	03	EJ697908	0	0	0	0	0	
26_AU	RD Congo		CD	02	F4877780	1	1	0	0	0	
26_AU	RD Congo		CD	02	F4877782	0	0	0	0	0	
26_AU	RD Congo		CD	97	F4877777	0	0	0	0	0	
27_cpx	RD Congo		CD	97	A904325	1	1	0	0	0	
27_cpx	Francia		FR	04	A9851091	1	1	0	0	0	
28_BF	Brasil		BR	99	D085872	0	0	0	0	0	
28_BF	Brasil		BR	99	D085873	0	0	0	0	0	
28_BF	Brasil		BR	99	D085874	0	0	0	0	0	
29_BF	Brasil		BR	01	D085876	0	0	0	0	0	
29_BF	Brasil		BR	02	A771390	0	0	0	0	0	
29_BF	Brasil		BR	99	D085871	0	0	0	0	0	
31_BC	Brasil		BR	02	E091932	0	0	0	0	0	
31_BC	Brasil		BR	04	A772756	0	0	0	0	0	
31_BC	Brasil		BR	04	A772757	0	0	0	0	0	
32_06A1	Estonia		EE	01	A935660	0	0	0	0	0	
33_01B	Indonesia		ID	07	A8547464	0	0	0	0	0	
33_01B	Malasia		MY	05	DQ366659	0	0	0	0	0	
33_01B	Malasia		MY	05	DQ366662	0	0	0	0	0	
34_01B	Tailandia		TH	99	E165541	0	0	0	0	0	
35_AD	Afganistán		AF	05	E158043	0	0	0	0	0	
35_AD	Afganistán		AF	05	E158040	0	0	0	0	0	
35_AD	Afganistán		AF	05	E158041	0	0	0	0	0	
36_cpx	Camerún		CM	00	F087995	0	0	0	0	0	
36_cpx	Camerún		CM	00	F087994	0	0	0	0	0	

A. Alineamiento de los cebadores ALL y SUD, y la sonda S-Gagp24 con los subtipos y CRFs de referencia del HIV-1 (continuación).

CRFs	Procedencia		País	Abreviatura	Año de ajuste	Número de acceso	ACCATCAATGAGGAGCTGC		GTACCTTCAGGACAAATA		mismatch	
							mismatch		mismatch			
37_cpx	Cameroon	CM	00	EF116584	0	0	2	3	0
37_cpx	Cameroon	CM	97	A4377957	1	0T.....	1	0	0
38_BF1	Uruguay	UY	04	F213791	0	0	1G.....	1	1
38_BF1	Uruguay	UY	04	F213792	0	0	0	0	0
38_BF1	Uruguay	UY	05	F213790	0	0	0A.....	0	0
39_BF	Brasil	BR	03	E1735534	0	0	0	0	0
39_BF	Brasil	BR	03	E1735536	0	0	0	0	0
39_BF	Brasil	BR	04	E1735535	0	0	0	0	0
40_BF	Brasil	BR	04	E1735538	0	0	1G.....	1	0
40_BF	Brasil	BR	04	E1735540	0	0	0	0	0
40_BF	Brasil	BR	05	E1735539	1	0A.....	0	0	0
42_BF	Luxemburgo	LU	03	E1170155	0	0	2G.....	2	0
43_O2G	Arabia Saudita	SA	03	E1697904	0	2T.....A.....	0	2	0
43_O2G	Arabia Saudita	SA	03	E1697907	0	2T.....A.....	0	2	0
43_O2G	Arabia Saudita	SA	03	E1697909	0	2T.....A.....	1A.....G.....	2	0
44_BF	Chile	CL	00	F185821	0	0	0	0	0
45_cpx	RD Congo	CD	97	F1932874	0	0	0	1	0
45_cpx	Cameroon	CM	97	F1932876	0	0	1C.....	2	0
45_cpx	Gabón	GA	97	F1932877	1	0Y.....	1	2	0
46_BF	Brasil	BR	01	Q038801	1	0T.....	0	0	0
46_BF	Brasil	BR	01	Q038802	0	0	1A.....	2	0
46_BF	Brasil	BR	07	HM026456	2	GG	0	2	0
47_BF	España	ES	08	G0372987	1	0T.....	0	0	0
47_BF	España	ES	08	F1670293	0	0	0	0	0
49_cpx	Gambia	GM	02	HQ385477	0	0	0	2	1
49_cpx	Gambia	GM	03	HQ385479	0	0	0C.....A.....	0	0
49_cpx	Gambia	GM	97	HQ385478	0	0	1A.....	1	0

Para la comparación de los cebadores (ALL-Fw vs SUD-F1) y antisentido (ALL-Rv vs SUD-R1), se marcan en verde cuando no se observan diferencias en el número de *mismatch*, en celeste cuando se observa una diferencia de un *mismatch*, y en rojo cuando hay diferencia de dos *mismatch* entre cada par. Los *mismatches* se muestran en anaranjado.

Y = C + T ; R = A + G ; M = C + A ; W = A + T

B. Alineamiento de los cebadores ALL y SUD, y la sonda S-Gagp24 con los subtipos, CRFs y URFs del HIV-1 circulantes en la región.

Subtipos	País	Procedencia	Abreviatura	Año de aislamiento	Número de secuencia	ALL-Fw		SUD-F1		ALL-Rv		SUD-R1		S-Gagp24	
						Mismatch	ACVATCAATGARGARGCTGCG	Mismatch	ACCATCAATGAGGAGCTGCG	Mismatch	GTACCTCTKAGGACAAATA	Mismatch	GTACCCCTTCAGGACAAATA	Mismatch	CCWAGGGGAGTGATATAGCG
B	Argentina	AR	AR	00	AY037269	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	Argentina	AR	02	DO383746	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	Argentina	AR	03	DO383748	0	0	0	0	0	1	G	0	1	G	C
B	Argentina	AR	03	DO383749	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	Argentina	AR	04	DO383750	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	Argentina	AR	04	DO383751	2	1	T	2	T	0	0	0	0	0	0
B	Argentina	AR	04	DO383752	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	Argentina	AR	98	AY037268	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	Argentina	AR	99	AY037282	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	Bolivia	BO	09	XJ40636	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	Brasil	BR	02	AY037270	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
B	Brasil	BR	02	DO358805	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	Brasil	BR	02	DO358808	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	Brasil	BR	02	DO358809	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	Brasil	BR	02	DO358810	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	Brasil	BR	02	JN62432	1	1	T	1	T	0	0	0	0	0	0
B	Brasil	BR	02	JN62435	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	Brasil	BR	02	JN62439	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	Brasil	BR	02	JN62440	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	Brasil	BR	02	JN62443	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	Brasil	BR	02	JN62444	2	1	T	2	T	0	0	0	0	0	0
B	Brasil	BR	02	JN62443	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	Brasil	BR	02	JN62470	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	Brasil	BR	03	JN62445	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	Brasil	BR	03	JN62447	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	Brasil	BR	03	FF637057	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	Brasil	BR	03	FF637056	1	1	T	1	T	0	0	0	0	0	0
B	Brasil	BR	03	FF637054	2	1	T	2	T	0	0	0	0	0	0
B	Brasil	BR	03	FF637053	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	Brasil	BR	03	FF637051	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	Brasil	BR	03	FF637050	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	Brasil	BR	03	FF637049	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	Brasil	BR	03	FF637048	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	Brasil	BR	03	FF637047	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	Brasil	BR	03	FF637046	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	Brasil	BR	04	JN62450	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	Brasil	BR	04	JN62451	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	Brasil	BR	04	JN62452	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	Brasil	BR	04	JN62453	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	Brasil	BR	04	JN62454	2	2	A	2	A	0	0	0	0	0	0
B	Brasil	BR	04	JN62455	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	Brasil	BR	04	JN62457	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	Brasil	BR	04	JN62457	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	Brasil	BR	04	I1195090	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	Brasil	BR	04	I1195086	1	1	T	1	T	0	0	0	0	0	0
B	Brasil	BR	05	JN62460	1	1	T	1	T	0	0	0	0	0	0
B	Brasil	BR	05	JN62461	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	Brasil	BR	05	JN62462	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	Brasil	BR	05	JN62463	1	1	T	1	T	0	0	0	0	0	0
B	Brasil	BR	05	JN62465	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	Brasil	BR	05	JN62467	1	1	C	1	C	0	0	0	0	0	0
B	Brasil	BR	05	JN62468	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	Brasil	BR	05	JN62471	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	Brasil	BR	05	JN62473	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	Brasil	BR	05	JN62474	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	Brasil	BR	05	JN62475	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	Brasil	BR	05	I1195091	2	0	0	2	0	1	C	0	1	C	0
B	Brasil	BR	05	I1195088	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	Brasil	BR	05	I1195089	1	1	T	1	T	0	0	0	0	0	0
B	Brasil	BR	06	JN62479	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	Brasil	BR	89	JN62480	1	1	T	1	T	0	0	0	0	0	0
B	Brasil	BR	00	A173956	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	Chile	CH	00	J2400022	2	2	T	2	T	0	0	0	0	0	0
B	Chile	CH	01	J2400023	1	1	T	1	T	0	0	0	0	0	0
B	Chile	CH	01	J2400024	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	Chile	CH	01	J2400025	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	Chile	CH	01	J2400026	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

B. Alineamiento de los cebadores ALL y SUD, y la sonda S-Gagp24 con los subtipos, CRFs y URFs del HIV-1 circulantes en la región (continuación).

	Procedencia			Año de aislamiento	Número de acceso	ACVATCAATGAGGCTGC				ACCAATGAGAACTGC				GTACCTTCAGGAACTGC				GTACCTTCAGGAACTGC																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																									
	País	Abreviatura	Mismatch			A	C	T	G	A	C	T	G	A	C	T	G	A	C	T	G																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
SUBTIPOS	B	Chile	CH	01	J2403026	0																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																					

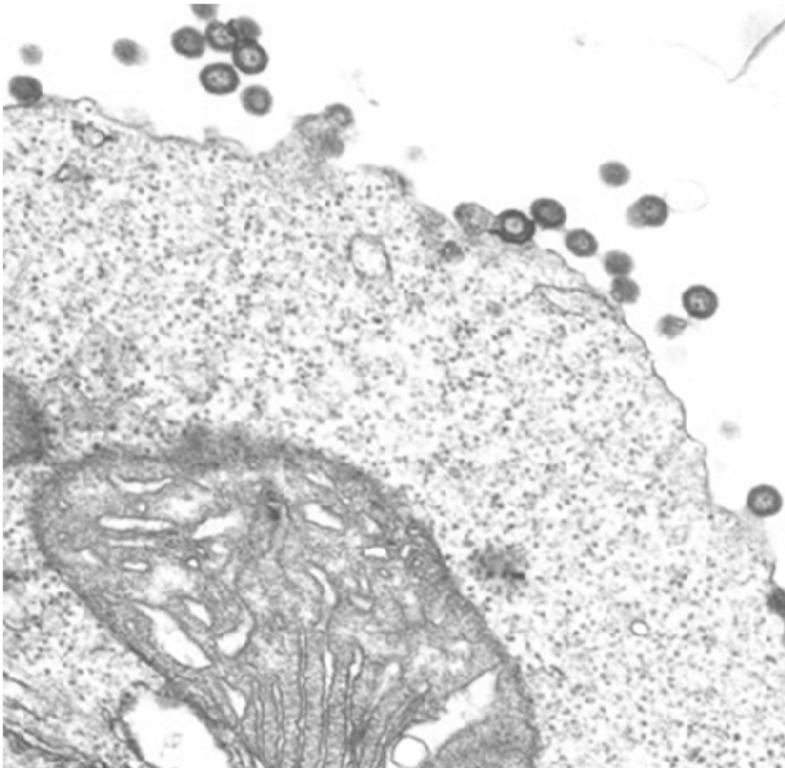
B. Alineamiento de los cebadores ALL y SUD, y la sonda S-Gagp24 con los subtipos, CRFs y URFs del HIV-1 circulantes en la región (continuación).

	País	Procedencia	Abreviatura	Año de ajustamiento	Número de acceso	ALL-Fw		SUD-F1		ALL-Rv		SUD-R1		S-Gagp24		
						Mismatch	A C Y A T C A A T G A R G A R G C T G C	Mismatch	A C C A T C A A T G A G G A A G C T G C	Mismatch	G T A C Y C Y K C A R G A R C A A A T A	Mismatch	G T A C C C T T C A G G A A C A A A T A	Mismatch	C C W A G G G A A G T G A T A G C	
CRFs	46_BF	Brasil	BR	01	DQ358801	1	1	1	1	2	0	0	0	0	0	0
	46_BF	Brasil	BR	01	DQ358802	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	46_BF	Brasil	BR	07	HM026456	2	GG	2	GG	1	0	0	3	1	0	0
	46_BF	Brasil	BR	07	HM026457	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
	46_BF	Brasil	BR	07	HM026458	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	46_BF	Brasil	BR	07	HM026459	5	C A - T	5	C A - T	0	0	0	0	0	0	0
CRFs	46_BF	Brasil	BR	07	HM026460	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	C
	BC	Argentina	AR	01	AY968312	2	T - T - T - T - G	3	T - T - T - G	0	0	0	0	0	0	0
	BC	Brasil	BR	01	GQ365651	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	BC	Brasil	BR	01	GQ365652	0	0	0	0	1	A	1	A	1	0	0
	BC	Brasil	BR	02	GQ365649	1	T	1	T	0	0	0	0	0	0	0
	BC	Brasil	BR	05	GQ365650	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	BC	Brasil	BR	06	JN692478	0	0	0	0	1	A	1	A	1	0	0
	BC	Brasil	BR	92	HM100716	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	BC	Uruguay	UY	02	JN235957	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	BCF1	Argentina	AR	04	DQ383754	0	0	0	0	2	G	2	G	2	0	0
BF	BF	Brasil	BR	03	EF637055	0	0	0	0	1	A	1	A	1	0	0
	BF	Brasil	BR	03	EF637052	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	BF	Uruguay	UY	00	JN235952	0	0	0	0	0	0	1	C	1	0	0
	BF	Uruguay	UY	01	AY781128	0	0	0	0	0	0	1	A	1	0	0
	BF	Uruguay	UY	01	JN235953	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	BF	Uruguay	UY	01	JN235956	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	BF	Uruguay	UY	99	JN235960	1	T	1	T	0	0	0	0	0	0	0
	BF	Uruguay	UY	99	JN235963	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	C
	BF	Uruguay	UY	99	AV037272	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	A
	BF1	Argentina	AR	02	DQ383747	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
URF	BF1	Argentina	AR	04	DQ383753	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	BF1	Argentina	AR	05	DQ383755	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	BF1	Brasil	BR	00	DQ085875	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	BF1	Brasil	BR	01	DQ358799	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	C
	BF1	Brasil	BR	01	DQ358800	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	BF1	Brasil	BR	01	DQ358803	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	BF1	Brasil	BR	01	DQ358804	2	G	2	G	0	0	0	0	0	0	0
	BF1	Brasil	BR	02	DQ358806	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	BF1	Brasil	BR	02	DQ358807	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	BF1	Brasil	BR	02	DQ358811	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
BF1	BF1	Brasil	BR	02	DQ358812	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	C
	BF1	Brasil	BR	02	JN692437	1	T	1	T	0	0	0	0	0	0	0
	BF1	Brasil	BR	03	JN692449	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	BF1	Brasil	BR	03	JN692448	0	0	0	0	2	A	2	A	2	1	C
	BF1	Brasil	BR	04	JN692456	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	BF1	Brasil	BR	05	JF804805	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	BF1	Brasil	BR	05	JF804808	0	0	0	0	1	G	1	G	1	0	0
	BF1	Brasil	BR	05	JF804810	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	BF1	Brasil	BR	05	JF804813	0	0	0	0	1	A	1	A	1	0	0
	BF1	Brasil	BR	06	HM026455	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
BF1	BF1	Brasil	BR	99	AY771588	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	BF1	Brasil	BR	99	AY771589	1	T	1	T	2	G	2	G	2	0	0
	BF1	Brasil	BR	99	DQ085869	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Para la comparación de los cebadores (ALL-Fw vs SUD-F1) y antisentido (ALL-Rv vs SUD-R1), se marcan en verde cuando no se observan diferencias en el número de *mismatch*, en celeste cuando se observa una diferencia de un *mismatch*, y en rojo cuando hay diferencia de dos *mismatch* entre cada par. Los *mismatches* se muestran en anaranjado.

$Y = C + T$; $R = A + G$; $M = C + A$; $W = A + T$

8. BIBLIOGRAFÍA



1. Poiesz, B.J., et al., *Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1980. **77**(12): p. 7415-9.
2. Kalyanaraman, V.S., et al., *Immunological properties of a type C retrovirus isolated from cultured human T-lymphoma cells and comparison to other mammalian retroviruses*. J Virol, 1981. **38**(3): p. 906-15.
3. Gottlieb, M.S., et al., *Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency*. N Engl J Med, 1981. **305**(24): p. 1425-31.
4. Vilmer, E., et al., *Isolation of new lymphotropic retrovirus from two siblings with haemophilia B, one with AIDS*. Lancet, 1984. **1**(8380): p. 753-7.
5. Barre-Sinoussi, F., et al., *Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS)*. Science, 1983. **220**(4599): p. 868-71.
6. Popovic, M., et al., *Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS*. Science, 1984. **224**(4648): p. 497-500.
7. Levy, J.A., et al., *Isolation of lymphocytopathic retroviruses from San Francisco patients with AIDS*. Science, 1984. **225**(4664): p. 840-2.
8. Ratner, L., et al., *Complete nucleotide sequence of the AIDS virus, HTLV-III*. Nature, 1985. **313**(6000): p. 277-84.
9. Coffin, J., et al., *Human immunodeficiency viruses*. Science, 1986. **232**(4751): p. 697.
10. Clavel, F., et al., *Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS*. Science, 1986. **233**(4761): p. 343-6.
11. Chakrabarti, L., et al., *Sequence of simian immunodeficiency virus from macaque and its relationship to other human and simian retroviruses*. Nature, 1987. **328**(6130): p. 543-7.
12. Holmes, E.C., *On the origin and evolution of the human immunodeficiency virus (HIV)*. Biol Rev Camb Philos Soc, 2001. **76**(2): p. 239-54.
13. Fields, B.N., D.M. Knipe, and P.M. Howley, *Fields virology*. 6th ed. 2013, Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins.
14. Hahn, B.H., et al., *AIDS as a zoonosis: scientific and public health implications*. Science, 2000. **287**(5453): p. 607-14.
15. Sharp, P.M. and B.H. Hahn, *Origins of HIV and the AIDS pandemic*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2011. **1**(1): p. a006841.
16. Gao, F., et al., *Human infection by genetically diverse SIVSM-related HIV-2 in west Africa*. Nature, 1992. **358**(6386): p. 495-9.
17. Hirsch, V.M., et al., *An African primate lentivirus (SIVsm) closely related to HIV-2*. Nature, 1989. **339**(6223): p. 389-92.
18. Silvestri, G., *Naturally SIV-infected sooty mangabeys: are we closer to understanding why they do not develop AIDS?* J Med Primatol, 2005. **34**(5-6): p. 243-52.
19. Onafuwa-Nuga, A. and A. Telesnitsky, *The remarkable frequency of human immunodeficiency virus type 1 genetic recombination*. Microbiol Mol Biol Rev, 2009. **73**(3): p. 451-80, Table of Contents.
20. Hemelaar, J., *The origin and diversity of the HIV-1 pandemic*. Trends Mol Med, 2012. **18**(3): p. 182-92.
21. Plantier, J.C., et al., *A new human immunodeficiency virus derived from gorillas*. Nat Med, 2009. **15**(8): p. 871-2.
22. Gao, F., et al., *Origin of HIV-1 in the chimpanzee Pan troglodytes troglodytes*. Nature, 1999. **397**(6718): p. 436-41.
23. Sadler, H.A., et al., *APOBEC3G contributes to HIV-1 variation through sublethal mutagenesis*. J Virol, 2010. **84**(14): p. 7396-404.
24. Van Heuverswyn, F., et al., *Human immunodeficiency viruses: SIV infection in wild gorillas*. Nature, 2006. **444**(7116): p. 164.
25. Guindon, S. and O. Gascuel, *A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood*. Syst Biol, 2003. **52**(5): p. 696-704.
26. Zhu, T., et al., *An African HIV-1 sequence from 1959 and implications for the origin of the epidemic*. Nature, 1998. **391**(6667): p. 594-7.
27. Worobey, M., et al., *Direct evidence of extensive diversity of HIV-1 in Kinshasa by 1960*. Nature, 2008. **455**(7213): p. 661-4.
28. Castro-Nallar, E., et al., *The evolution of HIV: inferences using phylogenetics*. Mol Phylogenet Evol, 2012. **62**(2): p. 777-92.
29. Requejo, H.I., *Worldwide molecular epidemiology of HIV*. Rev Saude Publica, 2006. **40**(2): p. 331-45.
30. Gilbert, M.T., et al., *The emergence of HIV/AIDS in the Americas and beyond*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(47): p. 18566-70.

31. Junqueira, D.M., et al., *Reviewing the history of HIV-1: spread of subtype B in the Americas*. PLoS One, 2011. **6**(11): p. e27489.
32. Lai, A., et al., *Local and global spatio-temporal dynamics of HIV-1 subtype F1*. J Med Virol, 2014. **86**(2): p. 186-92.
33. ONUSIDA, P.C.d.I.N.U.s.e.V.S.-. *Informe mundial: informe de ONUSIDA sobre la epidemia mundial de SIDA 2013*. 2013.
34. Peeters, M., M. Jung, and A. Ayoub, *The origin and molecular epidemiology of HIV*. Expert Rev Anti Infect Ther, 2013.
35. Sierra, S., B. Kupfer, and R. Kaiser, *Basics of the virology of HIV-1 and its replication*. J Clin Virol, 2005. **34**(4): p. 233-44.
36. Fields, B.N., D.M. Knipe, and P.M. Howley, *Fields virology*. 6th ed. 2013, Philadelphia: Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins Health. p.
37. Iordanskiy, S. and M. Bukrinsky, *Reverse transcription complex: the key player of the early phase of HIV replication*. Future Virol, 2007. **2**(1): p. 49-64.
38. Pugliese, A., et al., *A review of HIV-1 Tat protein biological effects*. Cell Biochem Funct, 2005. **23**(4): p. 223-7.
39. Suhasini, M. and T.R. Reddy, *Cellular proteins and HIV-1 Rev function*. Curr HIV Res, 2009. **7**(1): p. 91-100.
40. Vermeire, J., et al., *The Nef-infectivity enigma: mechanisms of enhanced lentiviral infection*. Curr HIV Res, 2011. **9**(7): p. 474-89.
41. Kogan, M. and J. Rappaport, *HIV-1 accessory protein Vpr: relevance in the pathogenesis of HIV and potential for therapeutic intervention*. Retrovirology, 2011. **8**: p. 25.
42. Malim, M.H. and P.D. Bieniasz, *HIV Restriction Factors and Mechanisms of Evasion*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2012. **2**(5): p. a006940.
43. Guo, F. and C. Liang, *Transmembrane interactions of HIV-1 Vpu and tetherin*. Curr HIV Res, 2012. **10**(4): p. 292-7.
44. Dalgleish, A.G., et al., *The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus*. Nature, 1984. **312**(5996): p. 763-7.
45. Deng, H., et al., *Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1*. Nature, 1996. **381**(6584): p. 661-6.
46. Gorry, P.R. and P. Ancuta, *Coreceptors and HIV-1 pathogenesis*. Curr HIV/AIDS Rep, 2011. **8**(1): p. 45-53.
47. Zlotnik, A. and O. Yoshie, *The chemokine superfamily revisited*. Immunity, 2012. **36**(5): p. 705-16.
48. Low, A.J., L.C. Swenson, and P.R. Harrigan, *HIV coreceptor phenotyping in the clinical setting*. AIDS Rev, 2008. **10**(3): p. 143-51.
49. Berger, E.A., P.M. Murphy, and J.M. Farber, *Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease*. Annu Rev Immunol, 1999. **17**: p. 657-700.
50. Alcamí, J. and M. Coiras, *[Immunopathogenesis of HIV infection]*. Enferm Infecc Microbiol Clin, 2011. **29**(3): p. 216-26.
51. Peterlin, B.M. and D. Trono, *Hide, shield and strike back: how HIV-infected cells avoid immune eradication*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(2): p. 97-107.
52. Hu, W.S. and S.H. Hughes, *HIV-1 reverse transcription*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2012. **2**(10).
53. Le Grice, S.F., *Human immunodeficiency virus reverse transcriptase: 25 years of research, drug discovery, and promise*. J Biol Chem, 2012. **287**(49): p. 40850-7.
54. Suzuki, Y. and M.L. Chew, *Role of host-encoded proteins in restriction of retroviral integration*. Front Microbiol, 2012. **3**: p. 227.
55. Craigie, R. and F.D. Bushman, *HIV DNA integration*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2012. **2**(7): p. a006890.
56. Krishnan, L. and A. Engelman, *Retroviral integrase proteins and HIV-1 DNA integration*. J Biol Chem, 2012. **287**(49): p. 40858-66.
57. Stevenson, M., *HIV-1 pathogenesis*. Nat Med, 2003. **9**(7): p. 853-60.
58. Alcamí, J., et al., *Absolute dependence on kappa B responsive elements for initiation and Tat-mediated amplification of HIV transcription in blood CD4 T lymphocytes*. EMBO J, 1995. **14**(7): p. 1552-60.
59. Pope, M. and A.T. Haase, *Transmission, acute HIV-1 infection and the quest for strategies to prevent infection*. Nat Med, 2003. **9**(7): p. 847-52.
60. Dandekar, S., *Pathogenesis of HIV in the gastrointestinal tract*. Curr HIV/AIDS Rep, 2007. **4**(1): p. 10-5.
61. Wu, L. and V.N. KewalRamani, *Dendritic-cell interactions with HIV: infection and viral dissemination*. Nat Rev Immunol, 2006. **6**(11): p. 859-68.
62. Haase, A.T., *Targeting early infection to prevent HIV-1 mucosal transmission*. Nature, 2010. **464**(7286): p. 217-23.

63. Richey, L.E. and J. Halperin, *Acute human immunodeficiency virus infection*. Am J Med Sci, 2013. **345**(2): p. 136-42.
64. Keele, B.F., et al., *Identification and characterization of transmitted and early founder virus envelopes in primary HIV-1 infection*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(21): p. 7552-7.
65. Appay, V. and D. Sauce, *Immune activation and inflammation in HIV-1 infection: causes and consequences*. J Pathol, 2008. **214**(2): p. 231-41.
66. Perelson, A.S., et al., *HIV-1 dynamics in vivo: virion clearance rate, infected cell life-span, and viral generation time*. Science, 1996. **271**(5255): p. 1582-6.
67. Douek, D.C., M. Roederer, and R.A. Koup, *Emerging concepts in the immunopathogenesis of AIDS*. Annu Rev Med, 2009. **60**: p. 471-84.
68. Kim, A.Y. and R.T. Chung, *Coinfection with HIV-1 and HCV--a one-two punch*. Gastroenterology, 2009. **137**(3): p. 795-814.
69. Gaardbo, J.C., et al., *Thirty Years with HIV Infection-Nonprogression Is Still Puzzling: Lessons to Be Learned from Controllers and Long-Term Nonprogressors*. AIDS Res Treat, 2012. **2012**: p. 161584.
70. Vannberg, F.O., S.J. Chapman, and A.V. Hill, *Human genetic susceptibility to intracellular pathogens*. Immunol Rev, 2011. **240**(1): p. 105-16.
71. Girard, M.P., et al., *Human immunodeficiency virus (HIV) immunopathogenesis and vaccine development: a review*. Vaccine, 2011. **29**(37): p. 6191-218.
72. Miro, J.M., et al., *[Advances in the diagnosis and treatment of acute human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection]*. Enferm Infecc Microbiol Clin, 2004. **22**(10): p. 643-59.
73. Forsman, A. and R.A. Weiss, *Why is HIV a pathogen?* Trends Microbiol, 2008. **16**(12): p. 555-60.
74. Garcia, F., et al., *[Laboratory diagnosis of HIV infection, viral tropism and resistance to antiretrovirals]*. Enferm Infecc Microbiol Clin, 2011. **29**(4): p. 297-307.
75. Daskalakis, D., *HIV diagnostic testing: evolving technology and testing strategies*. Top Antivir Med, 2011. **19**(1): p. 18-22.
76. Cornett, J.K. and T.J. Kirn, *Laboratory Diagnosis of HIV in Adults: A Review of Current Methods*. Clin Infect Dis, 2013. **57**(5): p. 712-8.
77. Smyth, R.P., M.P. Davenport, and J. Mak, *The origin of genetic diversity in HIV-1*. Virus Res, 2012. **169**(2): p. 415-29.
78. Simon, V. and D.D. Ho, *HIV-1 dynamics in vivo: implications for therapy*. Nat Rev Microbiol, 2003. **1**(3): p. 181-90.
79. Manrubia, S.C., et al., *High mutation rates, bottlenecks, and robustness of RNA viral quasispecies*. Gene, 2005. **347**(2): p. 273-82.
80. Domingo, E. and J.J. Holland, *RNA virus mutations and fitness for survival*. Annu Rev Microbiol, 1997. **51**: p. 151-78.
81. Novella, I.S., et al., *Exponential increases of RNA virus fitness during large population transmissions*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(13): p. 5841-4.
82. Domingo, E., *Genetic variation and quasi-species*. Curr Opin Genet Dev, 1992. **2**(1): p. 61-3.
83. Hill, A.L., D.I. Rosenbloom, and M.A. Nowak, *Evolutionary dynamics of HIV at multiple spatial and temporal scales*. J Mol Med (Berl), 2012. **90**(5): p. 543-61.
84. Abram, M.E., et al., *Nature, position, and frequency of mutations made in a single cycle of HIV-1 replication*. J Virol, 2010. **84**(19): p. 9864-78.
85. Mansky, L.M., *Mutagenic outcome of combined antiviral drug treatment during human immunodeficiency virus type 1 replication*. Virology, 2003. **307**(1): p. 116-21.
86. Weiss, K.K., et al., *A role for dNTP binding of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase in viral mutagenesis*. Biochemistry, 2004. **43**(15): p. 4490-500.
87. Chen, R., et al., *Vpr-mediated incorporation of UNG2 into HIV-1 particles is required to modulate the virus mutation rate and for replication in macrophages*. J Biol Chem, 2004. **279**(27): p. 28419-25.
88. Ronen, K., et al., *HIV-1 superinfection occurs less frequently than initial infection in a cohort of high-risk Kenyan women*. PLoS Pathog, 2013. **9**(8): p. e1003593.
89. Chaillon, A., et al., *Dynamics of viral evolution and neutralizing antibody response after HIV-1 superinfection*. J Virol, 2013. **87**(23): p. 12737-44.
90. Redd, A.D., et al., *The rates of HIV superinfection and primary HIV incidence in a general population in Rakai, Uganda*. J Infect Dis, 2012. **206**(2): p. 267-74.
91. Li, W.H., M. Tanimura, and P.M. Sharp, *Rates and dates of divergence between AIDS virus nucleotide sequences*. Mol Biol Evol, 1988. **5**(4): p. 313-30.

92. Sabino, E.C., et al., *Identification of human immunodeficiency virus type 1 envelope genes recombinant between subtypes B and F in two epidemiologically linked individuals from Brazil*. J Virol, 1994. **68**(10): p. 6340-6.
93. Robertson, D.L., et al., *HIV-1 nomenclature proposal*. Science, 2000. **288**(5463): p. 55-6.
94. Gomez Carrillo, M., et al., *Mother-to-child HIV type 1 transmission in Argentina: BF recombinants have predominated in infected children since the mid-1980s*. AIDS Res Hum Retroviruses, 2002. **18**(7): p. 477-83.
95. Bello, G., M.A. Soares, and C.G. Schrago, *The Use of Bioinformatics for Studying HIV Evolutionary and Epidemiological History in South America*. AIDS Res Treat, 2011. **2011**: p. 154945.
96. Melo, F.L., L.F. Jamal, and P.M. Zanotto, *Characterization of primary isolates of HIV type 1 CRF28_BF, CRF29_BF, and unique BF recombinants circulating in Sao Paulo, Brazil*. AIDS Res Hum Retroviruses, 2012. **28**(9): p. 1082-8.
97. Aulicino, P.C., et al., *Longitudinal analysis of HIV-1 BF1 recombinant strains in vertically infected children from Argentina reveals a decrease in CRF12_BF pol gene mosaic patterns and high diversity of BF unique recombinant forms*. Infect Genet Evol, 2011. **11**(2): p. 349-57.
98. Avila, M.M., et al., *Two HIV-1 epidemics in Argentina: different genetic subtypes associated with different risk groups*. J Acquir Immune Defic Syndr, 2002. **29**(4): p. 422-6.
99. Delgado, E., et al., *Identification of a new HIV type 1 BF intersubtype circulating recombinant form (CRF44_BF) in Chile*. AIDS Res Hum Retroviruses, 2010. **26**(7): p. 821-6.
100. Bello, G., et al., *Phylogenetics of HIV-1 circulating recombinant forms 12_BF and 38_BF in Argentina and Uruguay*. Retrovirology, 2010. **7**: p. 22.
101. Guimaraes, M.L., et al., *The HIV-1 epidemic in Bolivia is dominated by subtype B and CRF12_BF "family" strains*. Virol J, 2012. **9**: p. 19.
102. Sudha, T., V. Lakshmi, and V.D. Teja, *Western blot profile in HIV infection*. Indian J Dermatol Venereol Leprol, 2006. **72**(5): p. 357-60.
103. Pilcher, C.D., K.A. Christopoulos, and M. Golden, *Public health rationale for rapid nucleic acid or p24 antigen tests for HIV*. J Infect Dis, 2010. **201 Suppl 1**: p. S7-15.
104. Weber, B., *Screening of HIV infection: role of molecular and immunological assays*. Expert Rev Mol Diagn, 2006. **6**(3): p. 399-411.
105. Cobb, B.R., et al., *Evolution in the sensitivity of quantitative HIV-1 viral load tests*. J Clin Virol, 2011. **52 Suppl 1**: p. S77-82.
106. Administration, U.S.F.a.D. *Testing HCT/P Donors for Relevant Communicable Disease Agents and Diseases*. 2013 29/07/2013; Available from: <http://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/SafetyAvailability/TissueSafety/ucm095440.htm#approved>.
107. Hemelaar, J., et al., *Global trends in molecular epidemiology of HIV-1 during 2000-2007*. AIDS, 2011. **25**(5): p. 679-89.
108. Foglieni, B., et al., *A cluster of human immunodeficiency virus Type 1 recombinant form escaping detection by commercial genomic amplification assays*. Transfusion, 2011. **51**(4): p. 719-30.
109. Xiao, X., et al., *Comparative evaluation of a triplex nucleic acid test for detection of HBV DNA, HCV RNA, and HIV-1 RNA, with the Procleix Tigris System*. J Virol Methods, 2013. **187**(2): p. 357-61.
110. Muller, J., *Real-time RT-PCR for automated detection of HIV-1 RNA during blood donor screening*. Methods Mol Biol, 2010. **630**: p. 319-35.
111. Jain, R., P. Aggarwal, and G.N. Gupta, *Need for nucleic Acid testing in countries with high prevalence of transfusion-transmitted infections*. ISRN Hematol, 2012. **2012**: p. 718671.
112. AuBuchon, J.P., J.D. Birkmeyer, and M.P. Busch, *Safety of the blood supply in the United States: opportunities and controversies*. Ann Intern Med, 1997. **127**(10): p. 904-9.
113. Busch, M.P. and G.A. Satten, *Time course of viremia and antibody seroconversion following human immunodeficiency virus exposure*. Am J Med, 1997. **102**(5B): p. 117-24; discussion 125-6.
114. Busch, M.P., et al., *Committee report. Nucleic acid amplification testing of blood donors for transfusion-transmitted infectious diseases: Report of the Interorganizational Task Force on Nucleic Acid Amplification Testing of Blood Donors*. Transfusion, 2000. **40**(2): p. 143-59.
115. Courouce, A.M. and J. Pillonel, *[Estimation of risk of virus transmission in hepatitis B and C and human retrovirus via transfusion of labile blood derivatives]*. Transfus Clin Biol, 1996. **3**(1): p. 13-8.
116. Mimms, L.T., et al., *Effect of concurrent acute infection with hepatitis C virus on acute hepatitis B virus infection*. BMJ, 1993. **307**(6912): p. 1095-7.
117. Busch, M.P., et al., *Time course of detection of viral and serologic markers preceding human immunodeficiency virus type 1 seroconversion: implications for screening of blood and tissue donors*. Transfusion, 1995. **35**(2): p. 91-7.

118. CDC, *Outbreak of hepatitis C associated with intravenous immunoglobulin administration--United States, October 1993-June 1994*. MMWR Morb Mortal Wkly Rep, 1994. **43**(28): p. 505-9.
119. Flanagan, P., *Genomic screening of blood donations - the new dawn arrives*. Vox Sang, 1999. **76**(3): p. 135-7.
120. Saldanha, J., N. Lelie, and A. Heath, *Establishment of the first international standard for nucleic acid amplification technology (NAT) assays for HCV RNA*. WHO Collaborative Study Group. Vox Sang, 1999. **76**(3): p. 149-58.
121. Holmes, H., et al., *An international collaborative study to establish the 1st international standard for HIV-1 RNA for use in nucleic acid-based techniques*. J Virol Methods, 2001. **92**(2): p. 141-50.
122. Saldanha, J., et al., *An international collaborative study to establish a World Health Organization international standard for hepatitis B virus DNA nucleic acid amplification techniques*. Vox Sang, 2001. **80**(1): p. 63-71.
123. Saldanha, J., et al., *Establishment of the first World Health Organization International Standard for human parvovirus B19 DNA nucleic acid amplification techniques*. Vox Sang, 2002. **82**(1): p. 24-31.
124. CPM, ICH Topic Q2B: *Validation of analytical procedures: Methodology. Consensus Guideline*. (CPMP/ICH/281/95), 1996.
125. CPM, ICH Topic Q 2 (R1): *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. Consensus Guideline*. (CPMP/ICH/381/95), 1995.
126. Lelie, P.N., et al., *Sensitivity of HCV RNA and HIV RNA blood screening assays*. Transfusion, 2002. **42**(5): p. 527-36.
127. Nación, M.d.S.-P.d.l. *Boletín sobre el VIH-SIDA en la Argentina*. 2013 [cited 16 30]; Available from: http://www.msal.gov.ar/images/stories/bes/graficos/0000000297cnt-2013-11-28_boletin-epidemiologico-30.pdf.
128. Transfusión, A.C.d.I.T.p. *Las Pruebas de Biología Molecular (NAT) y la Seguridad Transfusional*. 2012; Available from: <http://www.aahi.org.ar/publicaciones/las-pruebas-de-biologia-molecular-nat-y-la-seguridad-transfusional-3>.
129. Hewlett, I.K. and J.S. Epstein, *Food and Drug Administration conference on the feasibility of genetic technology to close the HIV window in donor screening*. Transfusion, 1997. **37**(3): p. 346-51.
130. Nación, M.d.J.y.D.H.-P.d.l. *Decreto reglamentario de la ley de sangre humana Nº 22.990*. 2004; Available from: http://www.infojus.gov.ar/legislacion/decreto-nacional-1338-2004-decreto-reglamentario_ley_sangre.htm;jsessionid=bdfhcnfghpap10komtsm2ki8670.
131. Nación, M.d.S.-P.d.l. *Donde donar - Plan Nacional de Sangre*. 2013; Available from: http://www.msal.gov.ar/plan-nacional-sangre/index.php?option=com_content&view=article&id=309&Itemid=40.
132. Nación., M.d.S.-P.d.l. *Marco Legal Nacional - Plan Nacional de Sangre*. 2013; Available from: http://www.msal.gov.ar/plan-nacional-sangre/index.php?option=com_content&view=article&id=303&Itemid=34.
133. Nación., M.d.S.-P.d.l. *¿Qué estudios y preparación se le realiza a la sangre? - Plan Nacional de Sangre*. 2013; Available from: http://www.msal.gov.ar/plan-nacional-sangre/index.php?option=com_content&view=article&id=317&Itemid=58.
134. Grant, P.R. and M.P. Busch, *Nucleic acid amplification technology methods used in blood donor screening*. Transfus Med, 2002. **12**(4): p. 229-42.
135. Maschio, M.F., Cid G.; Fontana, D.; García C.W., *Sistema Nacional de Sangre*. Revista Argentina de Salud Pública, 2010. **1**(2): p. 40-42.
136. Guichon, A., et al., *Evaluation of a new NASBA assay for the qualitative detection of hepatitis C virus based on the NucliSens Basic Kit reagents*. J Clin Virol, 2004. **29**(2): p. 84-91.
137. Guichón A., A.M., Tomasone L., Rodriguez E., Fernandez R., *Evaluación y experiencia local en la utilización de NAT HCV basdo en amplificación por NASBA para el tamizaje de donaciones de sangre*. Rev Arg Transf, 2006. **32**(3-4): p. 85-91.
138. Noticias, T.-A.N.d., *Nuevo programa de testeo de VIH en el Garrahan*. Suplemento matutino Diario hecho en Télam S.E, 2013. **9**(2603): p. 4.
139. Ministerio de Salud del Gobierno de Córdoba, *Resolución Nº 618*. Boletín Oficial., 2010. **547**(150): p. 4.
140. Gen-Probe, I. *Procleix Ultrio Assay*. 2006; Available from: <http://www.fda.gov/downloads/BiologicsBloodVaccines/BloodBloodProducts/ApprovedProducts/LicensedProductsBLAs/BloodDonorScreening/InfectiousDisease/UCM335285.pdf>.
141. Gen-Probe, I. *Procleix HIV-1/HCV Assay*. 2004; Available from: <http://www.fda.gov/downloads/BiologicsBloodVaccines/BloodBloodProducts/ApprovedProducts/LicensedProductsBLAs/BloodDonorScreening/InfectiousDisease/UCM092036.pdf>.

142. Gen-Probe, I. *Procleix Ultrio Plus Assays*. 2012; Available from: <http://www.fda.gov/downloads/BiologicsBloodVaccines/BloodBloodProducts/ApprovedProducts/LicensedProductsBLAs/BloodDonorScreening/InfectiousDisease/UCM092120.pdf>.
143. Systems, R.M. *COBAS AmpliScreen HIV-1 Test v 1.5* 2007; Available from: <http://www.fda.gov/downloads/biologicsbloodvaccines/bloodbloodproducts/approvedproducts/licensedproductsblas/blooddonorscreening/infectiousdisease/ucm093744.pdf>.
144. Systems, R.M., *COBAS TaqScreen MPX Test* 2008.
145. Schwab, K.J., et al., *Use of heat release and an internal RNA standard control in reverse transcription-PCR detection of Norwalk virus from stool samples*. J Clin Microbiol, 1997. **35**(2): p. 511-4.
146. Pasloske, B.L., et al., *Armored RNA technology for production of ribonuclease-resistant viral RNA controls and standards*. J Clin Microbiol, 1998. **36**(12): p. 3590-4.
147. WalkerPeach, C.R., et al., *Ribonuclease-resistant RNA controls (Armored RNA) for reverse transcription-PCR, branched DNA, and genotyping assays for hepatitis C virus*. Clin Chem, 1999. **45**(12): p. 2079-85.
148. Vasiljeva, I., et al., *Mosaic Qbeta coats as a new presentation model*. FEBS Lett, 1998. **431**(1): p. 7-11.
149. Woody, M.A. and D.O. Cliver, *Effects of temperature and host cell growth phase on replication of F-specific RNA coliphage Q beta*. Appl Environ Microbiol, 1995. **61**(4): p. 1520-6.
150. Klovins, J., V. Berzins, and J. van Duin, *A long-range interaction in Qbeta RNA that bridges the thousand nucleotides between the M-site and the 3' end is required for replication*. RNA, 1998. **4**(8): p. 948-57.
151. Arora, R., et al., *cis-acting elements within an RNA coliphage genome: fold as you please, but fold you must!!* J Mol Biol, 1996. **258**(3): p. 433-46.
152. Kozlovskaya, T.M., et al., *Recombinant RNA phage Q beta capsid particles synthesized and self-assembled in Escherichia coli*. Gene, 1993. **137**(1): p. 133-7.
153. Katanaev, V.L., O.V. Kurnasov, and A.S. Spirin, *Viral Q beta RNA as a high expression vector for mRNA translation in a cell-free system*. FEBS Lett, 1995. **359**(1): p. 89-92.
154. Villanova, G.V., et al., *Strategic approach to produce low-cost, efficient, and stable competitive internal controls for detection of RNA viruses by use of reverse transcription-PCR*. J Clin Microbiol, 2007. **45**(11): p. 3555-63.
155. Friedman, S.D., et al., *Gene mapping and phylogenetic analysis of the complete genome from 30 single-stranded RNA male-specific coliphages (family Leviviridae)*. J Virol, 2009. **83**(21): p. 11233-43.
156. Young, K.K., R.M. Resnick, and T.W. Myers, *Detection of hepatitis C virus RNA by a combined reverse transcription-polymerase chain reaction assay*. J Clin Microbiol, 1993. **31**(4): p. 882-6.
157. Zijenah, L.S., et al., *Evaluation of the prototype Roche DNA amplification kit incorporating the new SSK145 and SKCC1B primers in detection of human immunodeficiency virus type 1 DNA in Zimbabwe*. J Clin Microbiol, 1999. **37**(11): p. 3569-71.
158. Schuppli, D., I. Barrera, and H. Weber, *Identification of recognition elements on bacteriophage Q beta minus strand RNA that are essential for template activity with Q beta replicase*. J Mol Biol, 1994. **243**(5): p. 811-5.
159. Gao, F., et al., *A comprehensive panel of near-full-length clones and reference sequences for non-subtype B isolates of human immunodeficiency virus type 1*. J Virol, 1998. **72**(7): p. 5680-98.
160. Adachi, A., et al., *Production of acquired immunodeficiency syndrome-associated retrovirus in human and nonhuman cells transfected with an infectious molecular clone*. J Virol, 1986. **59**(2): p. 284-91.
161. Sambrook, J. and D.W. Russell, *The condensed protocols from Molecular cloning : a laboratory manual*. 2006, Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press. v, 800 p.
162. Boyer, H.W. and S. Nicosia, *Genetic engineering : proceedings of the International Symposium on Genetic Engineering: Scientific Developments and Practical Applications held in Milan, Italy, 29-31 March, 1978*. Symposia of the Giovanni Lorenzini Foundation. 1978, Amsterdam ; New York: Elsevier/North Holland Biomedical Press ; sole distributors for the USA and Canada, Elsevier North-Holland. ix, 300 p.
163. Yamamoto, K.R., et al., *Rapid bacteriophage sedimentation in the presence of polyethylene glycol and its application to large-scale virus purification*. Virology, 1970. **40**(3): p. 734-44.
164. McDermott, J.L., et al., *Level of human immunodeficiency virus DNA in peripheral blood mononuclear cells correlates with efficacy of antiretroviral therapy*. J Clin Microbiol, 1999. **37**(7): p. 2361-5.
165. Chouhy, D., et al., *Development and evaluation of a colorimetric PCR system for the detection and typing of human papillomaviruses*. Int J Mol Med, 2006. **18**(5): p. 995-1003.
166. Chouhy, D., et al., *Prevalence of human papillomavirus infection in Argentinean women attending two different hospitals prior to the implementation of the National Vaccination Program*. J Med Virol, 2013. **85**(4): p. 655-66.
167. Walsh, E.E., et al., *Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) for diagnosis of respiratory syncytial virus infection in adults: use of a single-tube "hanging droplet" nested PCR*. J Med Virol, 2001. **63**(3): p. 259-63.

168. Chouhy, D., et al., *New generic primer system targeting mucosal/genital and cutaneous human papillomaviruses leads to the characterization of HPV 115, a novel Beta-papillomavirus species 3*. Virology, 2010. **397**(1): p. 205-16.
169. Chouhy, D., et al., *Identification of human papillomavirus type 156, the prototype of a new human gammapapillomavirus species, by a generic and highly sensitive PCR strategy for long DNA fragments*. J Gen Virol, 2013. **94**(Pt 3): p. 524-33.
170. Hall, T.A., *BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT*. Nucl. Acids. Symp. Ser., 1999. **41**: p. 95-98.
171. Larkin, M.A., et al., *Clustal W and Clustal X version 2.0*. Bioinformatics, 2007. **23**(21): p. 2947-8.
172. Ye, J., et al., *Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction*. BMC Bioinformatics, 2012. **13**: p. 134.
173. Darriba, D., et al., *jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing*. Nat Methods, 2012. **9**(8): p. 772.
174. Drummond, A.J., et al., *Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7*. Mol Biol Evol, 2012. **29**(8): p. 1969-73.
175. van Gemen, B., et al., *A one-tube quantitative HIV-1 RNA NASBA nucleic acid amplification assay using electrochemiluminescent (ECL) labelled probes*. J Virol Methods, 1994. **49**(2): p. 157-67.
176. Ayele, W., et al., *Development of a nucleic acid sequence-based amplification assay that uses gag-based molecular beacons to distinguish between human immunodeficiency virus type 1 subtype C and C' infections in Ethiopia*. J Clin Microbiol, 2004. **42**(4): p. 1534-41.
177. Bennett, J.M., et al., *A quantitative PCR method for the assay of HIV-1 provirus load in peripheral blood mononuclear cells*. J Virol Methods, 1999. **83**(1-2): p. 11-20.
178. Oehlschlager, F., P. Schwillie, and M. Eigen, *Detection of HIV-1 RNA by nucleic acid sequence-based amplification combined with fluorescence correlation spectroscopy*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(23): p. 12811-6.
179. Kuiken, C.F., B.; Leitner, T.; Apetrei, C.; Hahn, B.; Mizrahi, I.; Mullins, J.; Rambaut, A.; Wolinsky, S.; Korber, B., *HIV Sequence Compendium 2012.*, T.B.a.B. Group., Editor. 2012, Los Alamos National Laboratory: NM.
180. Lewis, G.D. and T.G. Metcalf, *Polyethylene glycol precipitation for recovery of pathogenic viruses, including hepatitis A virus and human rotavirus, from oyster, water, and sediment samples*. Appl Environ Microbiol, 1988. **54**(8): p. 1983-8.
181. Atha, D.H. and K.C. Ingham, *Mechanism of precipitation of proteins by polyethylene glycols. Analysis in terms of excluded volume*. J Biol Chem, 1981. **256**(23): p. 12108-17.
182. Lee, J.C. and L.L. Lee, *Preferential solvent interactions between proteins and polyethylene glycols*. J Biol Chem, 1981. **256**(2): p. 625-31.
183. Rumnieks, J. and K. Tars, *Crystal structure of the read-through domain from bacteriophage Qbeta A1 protein*. Protein Sci, 2011. **20**(10): p. 1707-12.
184. Holm, L. and P. Rosenstrom, *Dali server: conservation mapping in 3D*. Nucleic Acids Res, 2010. **38**(Web Server issue): p. W545-9.
185. Hofstetter H, M.H., Weissmann C., *The readthrough protein A1 is essential for the formation of viable Q beta particles*. Biochim Biophys Acta, 1974. **374**(2): p. 238-51.
186. Wang, S., F. Xu, and U. Demirci, *Advances in developing HIV-1 viral load assays for resource-limited settings*. Biotechnol Adv, 2010. **28**(6): p. 770-81.
187. Carr, J.K., et al., *Diverse BF recombinants have spread widely since the introduction of HIV-1 into South America*. AIDS, 2001. **15**(15): p. F41-7.
188. Scipioni, A., et al., *A SYBR Green RT-PCR assay in single tube to detect human and bovine noroviruses and control for inhibition*. Virol J, 2008. **5**: p. 94.
189. Martinez, E., et al., *Simultaneous detection and genotyping of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) by real-time RT-PCR and amplicon melting curve analysis using SYBR Green*. Res Vet Sci, 2008. **85**(1): p. 184-93.
190. Varga, A. and D. James, *Real-time RT-PCR and SYBR Green I melting curve analysis for the identification of Plum pox virus strains C, EA, and W: effect of amplicon size, melt rate, and dye translocation*. J Virol Methods, 2006. **132**(1-2): p. 146-53.
191. Pietila, J., et al., *Rapid differentiation of Borrelia garinii from Borrelia afzelii and Borrelia burgdorferi sensu stricto by LightCycler fluorescence melting curve analysis of a PCR product of the recA gene*. J Clin Microbiol, 2000. **38**(7): p. 2756-9.
192. Tanriverdi, S., et al., *Detection and genotyping of oocysts of Cryptosporidium parvum by real-time PCR and melting curve analysis*. J Clin Microbiol, 2002. **40**(9): p. 3237-44.

193. Helps, C., et al., *Melting curve analysis of feline calicivirus isolates detected by real-time reverse transcription PCR*. J Virol Methods, 2002. **106**(2): p. 241-4.
194. Nicolas, L., G. Milon, and E. Prina, *Rapid differentiation of Old World Leishmania species by LightCycler polymerase chain reaction and melting curve analysis*. J Microbiol Methods, 2002. **51**(3): p. 295-9.
195. Lamien, C.E., et al., *Real time PCR method for simultaneous detection, quantitation and differentiation of capripoxviruses*. J Virol Methods, 2011. **171**(1): p. 134-40.
196. Liao, Y., et al., *Simultaneous detection, genotyping, and quantification of human papillomaviruses by multicolor real-time PCR and melting curve analysis*. J Clin Microbiol, 2013. **51**(2): p. 429-35.
197. Owen, R.J., L.R. Hill, and S.P. Lapage, *Determination of DNA base compositions from melting profiles in dilute buffers*. Biopolymers, 1969. **7**(4): p. 503-16.
198. Wetmur, J.G., *DNA probes: applications of the principles of nucleic acid hybridization*. Crit Rev Biochem Mol Biol, 1991. **26**(3-4): p. 227-59.
199. von Ahlen, N., C.T. Wittwer, and E. Schutz, *Oligonucleotide melting temperatures under PCR conditions: nearest-neighbor corrections for Mg(2+), deoxynucleotide triphosphate, and dimethyl sulfoxide concentrations with comparison to alternative empirical formulas*. Clin Chem, 2001. **47**(11): p. 1956-61.
200. Christopherson, C., et al., *PCR-Based assay to quantify human immunodeficiency virus type 1 DNA in peripheral blood mononuclear cells*. J Clin Microbiol, 2000. **38**(2): p. 630-4.
201. Izopet, J., et al., *Quantification of HIV-1 proviral DNA by a standardized colorimetric PCR-based assay*. J Med Virol, 1998. **54**(1): p. 54-9.
202. Kabamba-Mukadi, B., et al., *Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) proviral DNA load in purified CD4+ cells by LightCycler real-time PCR*. BMC Infect Dis, 2005. **5**: p. 15.
203. Sanabani, S.S., et al., *Near full-length genome analysis of low prevalent human immunodeficiency virus type 1 subclade F1 in Sao Paulo, Brazil*. Virol J, 2009. **6**: p. 78.
204. Sa-Filho, D., et al., *Characterization of the full-length human immunodeficiency virus-1 genome from recently infected subjects in Brazil*. AIDS Res Hum Retroviruses, 2007. **23**(9): p. 1087-94.
205. Sanabani, S.S., et al., *Characterization of partial and near full-length genomes of HIV-1 strains sampled from recently infected individuals in Sao Paulo, Brazil*. PLoS One, 2011. **6**(10): p. e25869.
206. Inmunohematología, A.A.d.H.e., *Guías nacionales para el uso apropiado de la sangre y sus componentes*. Revista Argentina de Transfusión., 2007. **33**(3).
207. Banks, A.A.o.B. *Primer of Blood Administration*. 2012; Available from: <http://www.aabb.org/development/education/material/Pages/default.aspx>.
208. Roth, W.K., et al., *International survey on NAT testing of blood donations: expanding implementation and yield from 1999 to 2009*. Vox Sang, 2012. **102**(1): p. 82-90.
209. Wilks, M., *PCR detection of microbial pathogens*. 2nd ed. Methods in Molecular Biology,. 2013, New York: Humana Press. xi, 317 p.
210. Sachse, K. and J. Frey, *PCR detection of microbial pathogens*. Methods in molecular biology. 2003, Totowa, N.J.: Humana Press. xi, 334 p.
211. Hoorfar, J., et al., *Practical considerations in design of internal amplification controls for diagnostic PCR assays*. J Clin Microbiol, 2004. **42**(5): p. 1863-8.
212. Konet, D.S., et al., *Inhibitors of RT-PCR in serum*. J Virol Methods, 2000. **84**(1): p. 95-8.
213. Radstrom, P., et al., *Pre-PCR processing: strategies to generate PCR-compatible samples*. Mol Biotechnol, 2004. **26**(2): p. 133-46.
214. Vomelova, I., Z. Vanickova, and A. Sedo, *Methods of RNA purification. All ways (should) lead to Rome*. Folia Biol (Praha), 2009. **55**(6): p. 243-51.
215. Brown, D. and B.L. Pasloske, *Ribonuclease-resistant RNA controls and standards*. Methods Enzymol, 2001. **341**: p. 648-54.
216. Cheng, Y., et al., *Preparation of His-tagged armored RNA phage particles as a control for real-time reverse transcription-PCR detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus*. J Clin Microbiol, 2006. **44**(10): p. 3557-61.
217. Drake, J.W., *Comparative rates of spontaneous mutation*. Nature, 1969. **221**(5186): p. 1132.
218. Domingo, E., et al., *Nucleotide sequence heterogeneity of an RNA phage population*. Cell, 1978. **13**(4): p. 735-44.
219. Domingo, E., R.A. Flavell, and C. Weissmann, *In vitro site-directed mutagenesis: generation and properties of an infectious extracistronic mutant of bacteriophage Qbeta*. Gene, 1976. **1**(1): p. 3-25.
220. Olsthoorn, R.C. and J. van Duin, *Random removal of inserts from an RNA genome: selection against single-stranded RNA*. J Virol, 1996. **70**(2): p. 729-36.

221. Lin, K.T., et al., *Detection and identification of occult HBV in blood donors in Taiwan using a commercial, multiplex, multi-dye nucleic acid amplification technology screening test*. Vox Sang, 2014. **106**(2): p. 103-10.
222. Vermeulen, M., et al., *Sensitivity of individual-donation and minipool nucleic acid amplification test options in detecting window period and occult hepatitis B virus infections*. Transfusion, 2013. **53**(10 Pt 2): p. 2459-66.
223. Biasin, M., et al., *The genetic basis of resistance to HIV infection and disease progression*. Expert Rev Clin Immunol, 2013. **9**(4): p. 319-34.
224. van Manen, D., A.B. van 't Wout, and H. Schuitemaker, *Genome-wide association studies on HIV susceptibility, pathogenesis and pharmacogenomics*. Retrovirology, 2012. **9**: p. 70.
225. Santoro, M.M. and C.F. Perno, *HIV-1 Genetic Variability and Clinical Implications*. ISRN Microbiol, 2013. **2013**: p. 481314.
226. Guy, R., et al., *Accuracy of serological assays for detection of recent infection with HIV and estimation of population incidence: a systematic review*. Lancet Infect Dis, 2009. **9**(12): p. 747-59.
227. Rozera, G., et al., *Comparison of real-time PCR methods for measurement of HIV-1 proviral DNA*. J Virol Methods, 2010. **164**(1-2): p. 135-8.
228. Wirten, M., et al., *Impact of discrepancies between the Abbott realtime and cobas TaqMan assays for quantification of human immunodeficiency virus type 1 group M non-B subtypes*. J Clin Microbiol, 2009. **47**(5): p. 1543-5.
229. Sollis, K.A., et al., *Systematic review of the performance of HIV viral load technologies on plasma samples*. PLoS One, 2014. **9**(2): p. e85869.
230. Ruelle, J., et al., *HIV-1 low-level viraemia assessed with 3 commercial real-time PCR assays show high variability*. BMC Infect Dis, 2012. **12**: p. 100.
231. Gomes, P., et al., *Comparison of the NucliSENS EasyQ HIV-1 v2.0 with Abbott m2000rt RealTime HIV-1 assay for plasma RNA quantitation in different HIV-1 subtypes*. J Virol Methods, 2013. **193**(1): p. 18-22.
232. Bruzzone, B., et al., *Discordances with HIV-1 RNA quantitative determinations by three commercial assays in Pointe Noire, Republic of Congo*. J Virol Methods, 2014. **203**: p. 102-6.
233. McCutchan, F.E., *Global epidemiology of HIV*. J Med Virol, 2006. **78 Suppl 1**: p. S7-S12.
234. Delwart, E.L., et al., *Genetic relationships determined by a DNA heteroduplex mobility assay: analysis of HIV-1 env genes*. Science, 1993. **262**(5137): p. 1257-61.
235. Heyndrickx, L., et al., *Simplified strategy for detection of recombinant human immunodeficiency virus type 1 group M isolates by gag/env heteroduplex mobility assay*. Study Group on Heterogeneity of HIV Epidemics in African Cities. J Virol, 2000. **74**(1): p. 363-70.
236. Delwart, E.L., et al., *Genetic subtyping of human immunodeficiency virus using a heteroduplex mobility assay*. PCR Methods Appl, 1995. **4**(5): p. S202-16.
237. Gomez Carrillo, M., et al., *[Distribution of subtypes and recombinant of HIV. Situation in Argentina]*. Medicina (B Aires), 2001. **61**(6): p. 881-9.
238. Freitas, F.B., et al., *Novel multiregion hybridization assay for the identification of the most prevalent genetic forms of the human immunodeficiency virus type 1 circulating in Portugal*. AIDS Res Hum Retroviruses, 2013. **29**(2): p. 318-28.
239. Hoelscher, M., et al., *Detection of HIV-1 subtypes, recombinants, and dual infections in east Africa by a multi-region hybridization assay*. AIDS, 2002. **16**(15): p. 2055-64.
240. Herbing, K.H., et al., *Frequency of HIV type 1 dual infection and HIV diversity: analysis of low- and high-risk populations in Mbeya Region, Tanzania*. AIDS Res Hum Retroviruses, 2006. **22**(7): p. 599-606.
241. Hierholzer, J., et al., *Molecular Epidemiology of HIV Type 1 in Ecuador, Peru, Bolivia, Uruguay, and Argentina*. AIDS Res Hum Retroviruses, 2002. **18**(18): p. 1339-50.
242. Kijak, G.H., et al., *Development and application of a high-throughput HIV type 1 genotyping assay to identify CRF02_AG in West/West Central Africa*. AIDS Res Hum Retroviruses, 2004. **20**(5): p. 521-30.
243. Tong, S.Y. and P.M. Giffard, *Microbiological applications of high-resolution melting analysis*. J Clin Microbiol, 2012. **50**(11): p. 3418-21.
244. Er, T.K. and J.G. Chang, *High-resolution melting: applications in genetic disorders*. Clin Chim Acta, 2012. **414**: p. 197-201.
245. Cousins, M.M., et al., *HIV diversity as a biomarker for HIV incidence estimation: including a high-resolution melting diversity assay in a multiassay algorithm*. J Clin Microbiol, 2014. **52**(1): p. 115-21.
246. Li, P., et al., *Novel application of Locked Nucleic Acid chemistry for a Taqman assay for measuring diverse human immunodeficiency virus type 1 subtypes*. J Virol Methods, 2010. **170**(1-2): p. 115-20.
247. Maritz, J., G.U. van Zyl, and W. Preiser, *Irreproducible positive results on the Cobas AmpliPrep/Cobas TaqMan HIV-1 Qual test are different qualitatively from confirmed positive results*. J Med Virol, 2014. **86**(1): p. 82-7.

248. Rychlik, W., W.J. Spencer, and R.E. Rhoads, *Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro*. Nucleic Acids Res, 1990. **18**(21): p. 6409-12.
249. Owczarzy, R., et al., *Predicting sequence-dependent melting stability of short duplex DNA oligomers*. Biopolymers, 1997. **44**(3): p. 217-39.
250. Schutz, E. and N. von Ahsen, *Spreadsheet software for thermodynamic melting point prediction of oligonucleotide hybridization with and without mismatches*. Biotechniques, 1999. **27**(6): p. 1218-22, 1224.
251. Gibellini, D., et al., *Quantitative detection of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) proviral DNA in peripheral blood mononuclear cells by SYBR green real-time PCR technique*. J Clin Virol, 2004. **29**(4): p. 282-9.
252. Delatorre, E., et al., *Tracing the origin and northward dissemination dynamics of HIV-1 subtype C in Brazil*. PLoS One, 2013. **8**(9): p. e74072.
253. Aulicino, P.C., et al., *Circulation of novel HIV type 1 A, B/C, and F subtypes in Argentina*. AIDS Res Hum Retroviruses, 2005. **21**(2): p. 158-64.
254. Assal, A., et al., *Comparison of the analytical and operational performance of two viral nucleic acid test blood screening systems: Procleix Tigris and cobas s 201*. Transfusion, 2009. **49**(2): p. 289-300.
255. Cunningham, P., et al., *False negative HIV-1 proviral DNA polymerase chain reaction in a patient with primary infection acquired in Thailand*. J Clin Virol, 2003. **26**(2): p. 163-9.
256. Candotti, D. and J.P. Allain, *Molecular virology in transfusion medicine laboratory*. Blood Transfus, 2013. **11**(2): p. 203-16.
257. Chudy, M., et al., *Blood screening nucleic acid amplification tests for human immunodeficiency virus Type 1 may require two different amplification targets*. Transfusion, 2012. **52**(2): p. 431-9.
258. Cañizal, A.M.F.G., S.; Zapiola, I.; González, F.; Ralli, H.; Sosa, M.; Gómez Carrillo, M.; Bouzas, M.B., *Fallas en la cuantificación y detección de ácidos nucleicos de HIV-1 en una infección por recombinantes BF*. Actualizaciones en SIDA., 2009. **17**(S1): p. 61.
259. Stadhouders, R., et al., *The effect of primer-template mismatches on the detection and quantification of nucleic acids using the 5' nuclease assay*. J Mol Diagn, 2010. **12**(1): p. 109-17.
260. Geelen, S., et al., *Failure to detect a non-B HIV-1 subtype by the HIV-1 Amplicor Monitor test, version 1.5: a case of unexpected vertical transmission*. AIDS, 2003. **17**(5): p. 781-2.
261. Swanson, P., et al., *Impact of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) genetic diversity on performance of four commercial viral load assays: LCx HIV RNA Quantitative, AMPLICOR HIV-1 MONITOR v1.5, VERSANT HIV-1 RNA 3.0, and NucliSens HIV-1 QT*. J Clin Microbiol, 2005. **43**(8): p. 3860-8.
262. Swanson, P., et al., *Performance of the automated Abbott RealTime HIV-1 assay on a genetically diverse panel of specimens from Brazil*. J Virol Methods, 2006. **134**(1-2): p. 237-43.
263. Administration, U.S.F.a.D. *Antiretroviral drugs used in the treatment of HIV infection*. 2013; Available from: <http://www.fda.gov/ForConsumers/byAudience/ForPatientAdvocates/HIVandAIDSActivities/ucm118915.htm>.
264. (OMS), O.M.d.I.S., *El uso de medicamentos antirretrovíricos para el tratamiento y la prevención de la infección por el VIH*. 2013.

*“Terminus, una palabra arcaica
que significa «el final del trayecto»”*

Issac Asimov (Hacia la Fundación)

NOTAS

[illegible]

